

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ISADORA KANIAK IKEDA**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO FERMENTADO E BIOATIVO DA BIOMASSA DE  
*Spirulina platensis* COMO POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO**

**DISSERTAÇÃO**

**PONTA GROSSA**

**2021**

**ISADORA KANIAK IKEDA**

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO FERMENTADO E BIOATIVO DA BIOMASSA DE  
*Spirulina platensis* COMO POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO**

**Evaluation of fermented and bioactive extract of *Spirulina platensis* biomass as  
skin prebiotic potential**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alessandra Cristine Novak Sydney.

**PONTA GROSSA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ISADORA KANIAK IKEDA

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO FERMENTADO E BIOATIVO DA BIOMASSA DE SPIRULINA  
PLATENSIS COMO POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 18 de Agosto de 2021

Prof.a Alessandra Cristine Novak Sydney, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Jose Rosa Gomes, Doutorado - Universidade Estadual de Ponta Grossa (Uepg)

Prof.a Maria Carolina De Oliveira Ribeiro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 18/08/2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, Dono da minha vida e quem me conduziu por todo caminho até aqui, renovando minhas forças e me dando esperança em momentos difíceis.

Agradeço a minha família. Aos meus pais por todo carinho e sustento nesse período em que estive fora de casa, nas idas e vindas de Ponta Grossa e Curitiba. A minha irmã que sempre foi minha amiga e se alegra com minhas conquistas.

A meu noivo, Mathias Eduardo Thelen, por todo apoio, palavras de ânimo, por acreditar em mim mais do que eu mesma, por todo amor que me dá diariamente e que me ajudou a ter dias mais leves.

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra Cristine Novak Sydney, quem me acolheu antes mesmo de eu realizar minha inscrição no Programa de Mestrado, por confiar em mim nesse projeto, por me dar oportunidades de aprender ao seu lado e por me encorajar em situações que pareciam incertas. Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> José Rosa Gomes por ter me auxiliado imensamente no projeto anterior a esse e pela paciência em me ensinar novas técnicas. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Carolina Oliveira Ribeiro, pela ajuda em diversos momentos, seja com materiais, metodologias e interpretações de resultados. Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Eduardo Bittencourt Sydney, quem também sempre me auxiliou quando precisei e teve grande contribuição nesse trabalho.

A meus colegas de Mestrado, Sabrina Vieira, Maria Luísa Cerri, Alberto Maestre Pacheco e Thais Oliveira, que foram muito importantes nesse período, me dando companhia e compartilhando vários momentos da Universidade, assim como tantos outros com quem estive no Laboratório de Fermentações e Laboratório de Compostos Bioativos.

À toda estrutura do PPGBIOTEC, pelo espaço físico, conhecimento e recursos fornecidos para realização desse projeto.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela bolsa concedida.

## RESUMO

*Spirulina* sp. é uma cianobactéria que constitui um dos gêneros de microalgas mais estudados e produzidos mundialmente devido ao seu alto valor nutricional, rico em proteínas, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Também exerce efeitos terapêuticos por sua composição em compostos bioativos, inclusive na pele, na qual efetua diversos benefícios. Ademais, sua constituição contribui para seu efeito prebiótico intestinal. Tal característica permite sua exploração em outros tipos de microbiota, como a cutânea. Dentre diversos tipos de extração, a fermentação é uma técnica que tem sido aplicada para aumentar a atividade biológica de diferentes tipos de substratos. O objetivo desse trabalho foi avaliar, in vitro, se o extrato bioativo de *S. platensis* produzido por fermentação possui potencial ação prebiótica na pele. Foi realizada a otimização da fermentação com *Lactobacillus acidophilus* pela metodologia do tipo composto central rotacional utilizando os fatores tempo, volume de inóculo e temperatura. Para obter um extrato bioativo, as variáveis dependentes escolhidas foram o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e inibição do radical DPPH, respectivamente. A partir das melhores condições estipuladas, comparou-se a eficiência frente à extração sem inoculação de *L. acidophilus*. A mudança de bioatividade no processo foi avaliada ao longo de 48 horas em biomassa esterilizada (E) e não esterilizada (NE), com (I) e sem inóculo. No início e final da extração a carga microbiana foi determinada por contagem em placas. O potencial prebiótico cutâneo foi analisado pela influência dos extratos (2,5%) por 4 e 24 horas no crescimento das respectivas bactérias probiótica e patogênica: *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*. Com exceção da temperatura para inibição de DPPH, todos os fatores apresentaram-se significativos ( $p < 0,05$ ) para as respostas. Os modelos matemáticos gerados com baixo  $R^2$  mostraram-se imprecisos para prever o comportamento da fermentação. Pelas superfícies de respostas, verificou-se pouca influência da temperatura e inóculo, sendo tempo mais significativo. Em 40 horas de extração com 15% de inóculo a 37 °C, constatou-se que a ação do *L. acidophilus* não melhora a bioatividade do extrato, com CFT e inibição de DPPH menores em 14,13 e 40,10%, respectivamente. Em 48 horas de extração, observou-se o aumento gradual da bioatividade em EI, NE e NEI, com NE exibindo melhores resultados. Em EI fica evidente que tal aumento se deve à ação da monocultura de *L. acidophilus*. Todos os extratos apresentaram inibição das cepas de *Staphylococcus* em 4 horas. Após 24 horas o efeito diminuiu. Apenas NE apresentou uma inibição maior de *S. aureus* em relação a *S. epidermidis* em ambos os tempos (redução em log UFC/mL de 5,15 vs. 4,08 (4 h) e 1,97 vs. 0,64 (24 h), apresentando vantagem em termos de ação prebiótica. Conclui-se que adição de *L. acidophilus* à extração de *S. platensis* não aumenta a bioatividade em biomassa não esterilizada, assim como também não exerce efeito prebiótico cutâneo. Ainda assim, o extrato de *S. platensis* não inoculado pode ser melhor explorado para esse objetivo.

**Palavras-chave:** *Spirulina*. Bioatividade. Fermentação. Microbiota da pele.

## ABSTRACT

*Spirulina sp.* is a cyanobacterium constituent of one of the most studied and produced microalgae genres due to its high nutritional value, rich in proteins, fatty acids, vitamins and minerals. Also, it exerts therapeutic effects for its composition in bioactive compounds, including on skin, on which it performs many benefits. Moreover, its constitution contributes for its intestinal prebiotic effect. This characteristic allows its exploration in another microbiota types, as cutaneous one. Among diverse extraction methods, fermentation is a technique that has been applied to improve biological activity of different types of substrates. The aim of this work is to evaluate if the bioactive extract of *S. platensis* produced by fermentation has potential prebiotic action on skin. The optimization of the fermentation was done by central composite rotational design using the factors time, inoculum volume and temperature. To obtain a bioactive extract, dependent variables chosen were the content of total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity, determined by Folin-Ciocalteu method and the inhibition of DPPH radical, respectively. From the best stipulated conditions, its efficiency against the extraction without *L. acidophilus* inoculation was verified. The change of bioactivity in the process was evaluated along 48 hours in sterilized (S) and non-sterilized (NS), with (I) and without inoculum. At the beginning and end of extraction the microbial load was determined by plate count method. Cutaneous prebiotic potential was analyzed through the influence of the extracts (2,5%) in 4 and 24 hours in the growth of the respective probiotic and pathogen bacteria: *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. With exception of the temperature for DPPH inhibition, all the factors showed to be significative ( $p < 0,05$ ) to the both answers. The generated mathematical models with low  $R^2$  showed to be inaccurate to predict the fermentation behavior. Through response surfaces, it was verified the low influence of temperature and inoculum, being time the most significative. In 40 hours of extraction with 15% of inoculum in 37 °C, it was found *L. acidophilus* action does not improve extract bioactivity, with TPC and DPPH inhibition 14,13 ad 40,10% lower, respectively. In 48 hours of extraction, it was observed the gradual improve of bioactivity in SI, NS and NSI, with NS showing the best results. In SI was evident the improve was due to *L. acidophilus* monoculture. All the extracts inhibited *Staphylococcus* strains in 4 hours. After 24 hours the effect decreased. Only NS showed greater inhibition to *S. aureus* in relation to *S. epidermidis* in both times (reduction in log CFU/mL of 5.15 vs. 4.08 (4 h) and 1.97 vs. 0.64 (24 h), presenting advantage in prebiotic action. It was concluded the addition of *L. acidophilus* to *S. platensis* extraction does not improve its bioactivity with non-sterilized biomass, as well as it does not exert cutaneous prebiotic effect. Still, *S. platensis* extract non-inoculated could be better explored to this purpose.

Key words: *Spirulina*. Bioactivity. Fermentation. Skin microbiota.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da metodologia aplicada para a produção de extratos fermentados de <i>Spirulina platensis</i> .....	57
Figura 2 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus tempo e temperatura (primeiro planejamento experimental).....	68
Figura 3 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus tempo e inóculo (primeiro planejamento experimental).....	69
Figura 4 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus temperatura e inóculo (primeiro planejamento experimental).....	69
Figura 5 - Superfície de resposta de inibição de DPPH versus tempo e inóculo (primeiro planejamento experimental).....	70
Figura 6 - Superfície de resposta de inibição de DPPH versus tempo e temperatura (primeiro planejamento experimental).....	71
Figura 7 - Superfície de resposta de inibição de DPPH versus temperatura e inóculo (primeiro planejamento experimental).....	71
Figura 8 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus tempo e inóculo (segundo planejamento experimental).....	73
Figura 9 - Superfície de resposta de Inibição de DPPH versus tempo e inóculo (segundo planejamento experimental).....	73
Figura 10 - Lâmina de Coloração de Gram de NE .....	79
Figura 11 - Lâmina de Coloração de Gram de NEI .....	80
Figura 12 - Lâmina de Coloração de Gram de EI.....	80

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Conteúdo de compostos fenólicos totais em 48 horas de extração de <i>S. platensis</i> de E, EI, NE e NEI.....	76
Gráfico 2 - Inibição de DPPH em 48 horas de extração de <i>S. platensis</i> de E, EI, NE e NEI .....	77



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional do pó de <i>Spirulina</i> sp. (dados da produção de 2011 da Earthrise).....	17
Tabela 2 - Composição da <i>Spirulina platensis</i> comercializada pela Ocean Drop (valores para porção de 100 gramas) .....	56
Tabela 3 - Níveis dos fatores aplicados para a otimização da fermentação ácido láctica da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> .....	59
Tabela 4 - Níveis dos fatores aplicados para o segundo planejamento experimental da fermentação ácido láctica da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> .....	60
Tabela 5 – Matriz do primeiro planejamento experimental para a fermentação ácido láctica de <i>Spirulina platensis</i> com valores reais e as respostas compostos fenólicos totais e inibição de DPPH.....	66
Tabela 6 - Valores- <i>p</i> de cada fator nos modelos matemáticos preditivos para as respostas de compostos fenólicos totais e inibição de DPPH.....	67
Tabela 7 – Matriz do segundo planejamento experimental para a fermentação ácido láctica de <i>Spirulina platensis</i> com valores reais e as respostas compostos fenólicos totais e inibição de DPPH.....	72
Tabela 8 - Compostos fenólicos totais e inibição de DPPH dos extratos de <i>S. platensis</i> sem inóculo de <i>L. acidophilus</i> (S) e com inóculo de <i>L. acidophilus</i> (SL)....	74
Tabela 9 - Concentração de bactérias no início e final das diferentes extrações.....	79
Tabela 10 - Contagem bacteriana de <i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i> após 4 e 24 horas de contato com 2,5% dos extratos de <i>S. platensis</i> .....	82

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 <i>Spirulina</i> sp. ....	14
2.1.1 Composição Bioquímica .....	16
2.1.2 Bioatividade .....	19
2.1.3 Aplicações Dermatológicas.....	24
2.1.4 Potencial Prebiótico .....	32
2.2 PRÉ E PROBIÓTICOS NA PELE .....	43
2.3 FERMENTAÇÃO COMO MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOATIVIDADE.....	49
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>56</b>
4.1 BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i> .....	56
4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS FERMENTADOS DE <i>Spirulina platensis</i> .....	57
4.2.1 Bactérias Ácido Lácticas .....	57
4.2.2 Produção do Inóculo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	58
4.2.3 Fermentação da Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> .....	58
4.2.4 Otimização da Extração de <i>Spirulina platensis</i> Através da Fermentação Ácido Láctica com <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	59
4.2.5 Influência do Inóculo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> na Extração de <i>Spirulina platensis</i> .....	60
4.2.5.1 Extração de <i>Spirulina platensis</i> com e sem inóculo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> com biomassa esterilizada e biomassa não esterilizada .....	60
4.2.6 Obtenção dos extratos .....	61
4.2.7 Tratamento estatístico .....	62
4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	62
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	63
4.5 POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO DOS EXTRATOS DE <i>Spirulina platensis</i> .....	64
4.5.1 Bactérias <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
4.5.2 Produção de Inóculos de <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
4.5.3 Ensaio <i>in vitro</i> de Potencial Prebiótico Cutâneo .....	65
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE <i>Spirulina platensis</i> ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO ÁCIDO LÁCTICA COM <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	66
5.2 INFLUÊNCIA DO INÓCULO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> NA EXTRAÇÃO DE <i>Spirulina platensis</i> .....	74

5.3 POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO DOS EXTRATOS DE <i>Spirulina platensis</i> .....	82
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>87</b>
<b>Referências .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Microalgas são seres fotossintetizantes amplamente conhecidos pela capacidade de produzir metabólitos secundários de alto valor agregado. Esse grupo de microrganismos é constituído por eucarióticos, que incluem as algas verdes, e procarióticos, que faz referência às cianobactérias. Devido a sua estrutura simples, boa capacidade adaptativa e alta taxa de crescimento, as microalgas são largamente estudadas como fonte de compostos de potencial biotecnológico para diversos tipos de indústrias. Uma das microalgas mais conhecidas e produzidas é a cianobactéria *Spirulina* sp., sendo que 60% da biomassa microalgal produzida mundialmente em larga escala corresponde a sua produção (MITRA; MISHRA, 2019).

*Spirulina* é um gênero amplamente conhecido devido ao seu alto valor nutricional, cuja biomassa apresenta-se rica em proteínas, aminoácidos, ácidos graxos insaturados, minerais e vitaminas. Tal composição é motivo de sua comercialização ao redor do mundo, sendo principalmente utilizada para alimentação humana e animal, seja como alimento ou apenas suplemento. Além disso, cada vez mais *Spirulina* tem sido considerada fonte de compostos de alto valor biológico, incluindo ficobiliproteínas, carotenoides, polissacarídeos e compostos fenólicos, encontrando aplicações em produtos funcionais na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Outra aplicação dessa microalga, porém, menos explorada, é sua capacidade prebiótica. Atualmente, pró e prebióticos têm sido extensivamente estudados frente a importância da microbiota humana na saúde do organismo. *Spirulina* sp., devido a sua composição rica em polissacarídeos e vitaminas, possui o potencial de estimular o crescimento de bactérias intestinais benéficas e, como consequência, melhorar a qualidade de vida do hospedeiro.

Assim como ocorre no intestino, a microbiota da pele é de extrema importância para a homeostase do organismo. Os microrganismos cutâneos comensais possuem funções chave na proteção contra a colonização de patógenos e na modulação do sistema imune da pele. Diversas doenças inflamatórias cutâneas estão associadas ao desequilíbrio dessa microbiota. Nesse sentido, a aplicação de prebióticos e probióticos também tem sido explorada de forma crescente na área da

dermatologia. Não existem, contudo, estudos que indiquem o potencial prebiótico da *Spirulina* sp. na pele.

A fermentação é um método tradicional utilizado para a preservação e melhoramento das características de alimentos. Por meio da ação de microrganismos, diversas moléculas do substrato são biotransformadas e bioativos são produzidos. Como resultado, alimentos fermentados apresentam texturas, odores e gostos diferenciados, além de serem menos suscetíveis a contaminações. Ainda, muitos apresentam um maior valor biológico em relação ao alimento cru, caracterizando-os como funcionais. Assim, a fermentação torna-se uma tática para melhorar a bioatividade de outros tipos de substratos, como plantas, grãos, frutas e extratos. Essa abordagem consiste em um método de extração e produção de compostos ativos de interesse farmacológico e cosmético. Na literatura é possível encontrar estudos em que essa estratégia é utilizada para realizar a extração da biomassa de *Spirulina* sp., obtendo extratos com um maior conteúdo de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante. Ainda assim, é um processo que precisa ser mais estudado e otimizado, procurando as melhores cepas e condições que gerem um extrato de grande bioatividade.

Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo avaliar a capacidade prebiótica cutânea do extrato fermentado e com atividade biológica da biomassa de *Spirulina platensis*, utilizando bactérias ácido lácticas e otimizando as condições de fermentação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Spirulina* sp.

A morfologia de *Spirulina* sp. consiste no arranjo de células cilíndricas, compondo filamentos nomeados tricomas. Esses apresentam, de maneira geral, formas helicoidais de 50 a 500  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro, características que, assim como o grau de enrolamento, variam de acordo com a espécie (VO; NGO; KIM, 2015; WAN; WU; KUČA, 2016). Contudo, fatores ambientais, físicos e químicos e alterações genéticas podem afetar sua geometria, sendo possível encontrar culturas também na forma espiral e até mesmo reta, sem nenhum grau de enrolamento (BELAY, 2007; TOMASELLI, 1997). Diferenças em suas dimensões e características morfológicas podem distinguir, inclusive, entre uma mesma espécie, tal qual é sua dependência das condições de crescimento (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012).

Sua membrana celular é revestida por uma parede celular fina e mole de múltiplas camadas, a qual contém peptidoglicanos e é isenta de celulose, o que facilita a digestão de sua biomassa assim como a obtenção de seus compostos (CIFERRI, 1983; LUPATINI *et al.*, 2017). Adicionalmente, o tricoma é revestido por uma bainha fina e difusa de cerca de 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura, a qual possui estrutura fibrilar em forma de rede (TOMASELLI, 1997). Seu arranjo filamentoso apresenta paredes transversais evidentes e são abundantes de vacúolos de gás, responsáveis pela formação de agregados flutuantes em seus cultivos.

Sua reprodução se dá de forma assexuada através de fissão binária. Assim, o alongamento do filamento da cianobactéria ocorre por múltiplas divisões celulares intercalares ao longo do tricoma, enquanto a fragmentação causa sua multiplicação (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012).

*Spirulina* sp. é considerado um microrganismo ubíquo, sendo encontrando no solo, pântanos, água doce e salobra, mar e fontes termais (CIFERRI, 1983). Contudo, sua principal ocorrência se dá em águas salinas e alcalinas com elevado valor de pH (8,5-11,0). Essas características criam um ambiente hostil, dificultando o crescimento de outras algas. Dessa maneira, é comum encontrar populações de *Spirulina* sp. quase monoespecíficas. Quanto maior o pH e a condutividade da água,

a predominância da cianobactéria é mais favorecida (BELAY, 2007; HABIB *et al.*, 2008). Adicionalmente, seu crescimento acontece sob forte irradiação solar, sendo seu isolamento normalmente realizado em regiões tropicais e subtropicais.

Alguns locais considerados habitats para a *Spirulina* sp. são o Oceano Pacífico, perto do Japão e Havaí, e lagos como Lago Chad (África), Lago Klamath (América do Norte), Lago Texcoco (México) e Lago Titikaka (América do Sul) (KULSHRESHTHA *et al.*, 2008). Dentre as várias espécies, *S. platensis* é a mais distribuída, aparecendo principalmente na África, Ásia e América do Sul. Já *S. maxima* é predominantemente encontrada na América Central (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012).

Apesar de ser produzida comercialmente há apenas algumas décadas, o consumo de *Spirulina* sp, pelo ser humano ocorre há centena de anos. A utilização da cianobactéria como alimento é datada desde o século 16, quando os espanhóis chegaram ao México e observaram que os astecas consumiam uma espécie de torta verde, a qual chamavam de *tecuítlatl*. Em um registro feito por Bernal Diaz del Castillo, há a descrição de que a população ao redor do Lago Texcoco colhia essa massa do lago, que era secada e vendida em pequenos pedaços no mercado local. Acredita-se que esse alimento seria constituído de *Spirulina maxima* (BELAY, 2007; KAY; BARTON, 1991). O *tecuítlatl* ainda foi mencionado em outros registros durante a conquista espanhola, porém, apenas até o fim do século 16, tendo sido uma prática provavelmente perdida durante a conquista (CIFERRI, 1983).

Séculos depois, em 1940, o ficologista francês Dangeard descreveu um material chamado *dihé*, um bolo de alga que era consumido pela tribo Kanembu na África Equatorial Francesa (atual República de Chad). O *dihé* era obtido a partir de algas flutuantes em pequenos lagos e poços ao redor do Lago Chad, as quais eram recolhidas e secadas ao sol, resultando na massa algal que era comercializada. Dangeard observou que o *dihé* era constituído de uma alga filamentosa, espiralada e azul, a *Spirulina platensis*. Cerca de 25 anos depois, *dihé* foi redescoberto pelo botanista Jean Léonard, o qual confirmou a *S. platensis* como seu constituinte quase exclusivo (CIFERRI, 1983; WAN; WU; KUČA, 2016).

Na mesma época, um grupo do Instituto Francês do Petróleo isolou a espécie *S. maxima*, que estava crescendo de forma abundante em uma instalação industrial de carbonato de sódio no Lago Texcoco no México. A primeira produção comercial de *Spirulina* sp. foi estabelecida através da coleta da cianobactéria do

Lago Texococo, com início na década de 1970. Já em 1978, a Dainippon Ink & Chemicals Inc., empresa tailandesa, foi pioneira na produção de *Spirulina* comercial em lagoas artificiais (BELAY, 2013).

Atualmente, *Spirulina* sp. é produzida comercialmente em pelo menos 22 países, segundo apresentado por Belay (2013), e consumida em cerca de 77 países. Desses países, destacam-se os da Europa e da Ásia Pacífica. Estima-se que a produção mundial de *Spirulina* possua o valor de 40 milhões de dólares (MOONS; BARBAROSSA; DE PELSMACKER, 2018).

No mercado, *Spirulina* sp. encontra-se disponível na forma de pó, seja em potes, cápsulas ou tabletes. Seu pó também pode ser encontrado dentro de fórmulas de suplementos, humanos ou animais, ou de alimentos e bebidas. Além disso, parte da produção de biomassa de *Spirulina* sp. também é destinada a componentes isolados, os quais são utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

### 2.1.1 Composição Bioquímica

Segundo Hoseini (2013), a composição geral da biomassa seca de *Spirulina* sp. consiste em 50-70% de proteínas, 15-25% de carboidratos, 6-13% de lipídeos, 4,2-6% de ácidos nucleicos e 2,2-4,8% de minerais. É importante ressaltar que os valores são amplamente variáveis, pois dependem da espécie, meio de cultivo utilizado, fatores ambientais de crescimento, modo de operação e processamento da biomassa e armazenamento. A Tabela 1 mostra a composição do pó de *Spirulina* sp. produzido pela Earthrise, indústria localizada na Califórnia.



**Tabela 1 - Composição nutricional do pó de *Spirulina* sp. (dados da produção de 2011 da Earthrise)**

Composition <sup>a</sup>	Per 100 g	Composition <sup>a</sup>	Per 100 g
<b>Macronutrients</b>		<b>Vitamins</b>	
Calories	382 cal	Vitamin A (as 100% $\beta$ -carotene)	360 000 IU
Total fat	7.5 g	Vitamin K	1080 mcg
Saturated fat	2.71 g	Thiamine HCl (vitamin B1)	0.09 mg
Polyunsaturated fat	2.57 g	Riboflavin (vitamin B2)	3.66 mg
Monounsaturated fat	0.418 g	Niacin (vitamin B3)	16.8 mg
Cholesterol	<1 mg	Vitamin B6 (pyridox. HCl)	0.839 mg
Total carbohydrate	14.6 g	Vitamin B12	226 mcg
Dietary fiber	7.72 g	<b>Minerals</b>	
Sugars	<0.1 g	Calcium	288 mg
Lactose	<0.1 g	Iron	53.9 mg
Protein	67.5 g	Phosphorus	975 mg
<b>Essential amino acids (mg)</b>		Iodine	549 mcg
Histidine	1010	Magnesium	292 mg
Isoleucine	3490	Zinc	1.4 mg
Leucine	5400	Selenium	21.3 mcg
Lysine	3050	Copper	0.383 mg
Methionine	1360	Manganese	2.86 mg
Phenylalanine	2770	Chromium	<990 mcg
Threonine	2990	Potassium	1620 mg
Tryptophan	920	Sodium	692 mg
Valine	3320	<b>Phytonutrients</b>	
<b>Nonessential amino acids (mg)</b>		Phycocyanin (mean) <sup>b</sup>	17.8%
Alanine	4400	Chlorophyll (mean) <sup>b</sup>	1.2%
Arginine	4550	Gamma linolenic acid (GLA)	1.39 g
Aspartic acid	6120	Total carotenoids (mean) <sup>b</sup>	509 mg
Cystine	566	$\beta$ -carotene (mean) <sup>b</sup>	227 mg
Glutamic acid	8900	Zeaxanthin	116 mg
Glycine	3030		
Proline	2270		
Serine	2780		
Tyrosine	2790		

Fonte: Belay (2013)

O teor de proteína dessa cianobactéria foi o que inicialmente motivou sua produção comercial para consumo. Em 1967, uma primeira análise nutricional completa de sua biomassa foi realizada, a qual constatou o conteúdo proteico elevado e de qualidade, demonstrando um bom balanço de aminoácidos essenciais. A partir disso, *Spirulina* sp. foi rotulada como uma “maravilhosa fonte de alimento do futuro” na Associação Internacional de Microbiologia Aplicada (VO; NGO; KIM, 2015). A maioria das microalgas costumam apresentar um alto conteúdo de proteína, mas as espécies *Spirulina* sp., de fato, demonstram os maiores valores (BARKA; BLECKER, 2016).

Segundo Henrikson (2010), a biomassa seca de *Spirulina* sp. possui um teor de proteína maior que qualquer outro alimento natural, como carne (15-25%), soja (35%), leite em pó (35%), ovos (12%) e cereais (8-14%). Além disso, é considerada

uma fonte proteica completa, uma vez que detém todos os aminoácidos essenciais, os quais representam cerca de 47% da proteína total (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017), sendo os principais leucina, valina e isoleucina (HABIB *et al.*, 2008; HENRIKSON, 2010). Outra vantagem é a ausência de celulose na sua parede celular, o que torna a proteína de *Spirulina* sp. mais facilmente digerida e assimilada quando comparada a de outras microalgas (HASHEMIAN *et al.*, 2019; HENRIKSON, 2010).

Em relação a carboidratos, *Spirulina* sp. não apresenta alto conteúdo. O maior componente polimérico presente na sua biomassa é um polissacarídeo ramificado, similar ao glicogênio (HOSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013). Sua composição é constituída principalmente por glicose, ramnose, manose, xilose, galactose, 2-O-metil-L-ramnose e 3-O-metil-L-ramnose (KORU, 2012).

Os lipídeos também são presentes em menores quantidades. Ainda assim, são de extrema importância na composição dessa cianobactéria. Metade desses lipídeos são ácidos graxos e colesterol, o qual se apresenta em níveis muito baixos. *Spirulina* sp. é conhecida por ser uma boa fonte de ácidos graxos poli-insaturados (1,5-2,0% dos lipídeos totais), principalmente de ácidos graxos essenciais. O principal deles é o ácido  $\gamma$ -linolênico, o qual corresponde a 30-35% dos ácidos graxos poli-insaturados totais (REBOLEIRA *et al.*, 2019), sendo a *Spirulina* sp. uma das raras e mais ricas fontes desse ácido, componente com diversas propriedades medicinais. Além disso, a cianobactéria possui os ácidos  $\alpha$ -linoleico, linoleico, ácido estearidônico, eicosapentaenóico, docosahexaenoico, araquidônico, palmítico, dentre outros (HABIB *et al.*, 2008).

Em adição aos macronutrientes, *Spirulina* sp. possui uma grande variedade de micronutrientes. Das vitaminas, destacam-se as vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B6, B9 e B12), as quais estão presentes em maior quantidade em sua biomassa do que em outras fontes vegetais. Também é uma das fontes mais ricas em  $\beta$ -caroteno, o precursor de vitamina A. Em menores quantidades, possui vitamina C, vitamina E, biotina, dentre outros (HENRIKSON, 2010). Diversos minerais também são encontrados na *Spirulina* sp. (Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, Mg, P, Se, Na e Zn), com destaque para o ferro. A cianobactéria chega a ter 10 vezes mais ferro que outras fontes, além de ser bem absorvido pelo organismo (HOSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013).

Diante desse alto valor nutricional, *Spirulina* sp. é amplamente empregada como suplemento alimentar e como aditivos em alimentos, a fim de criar alimentos funcionais (LAFARGA *et al.*, 2020). Sua biomassa também se torna matéria prima para ração animal, tanto para animais de companhia quanto para animais da pecuária (HASHEMIAN *et al.*, 2019).

### 2.1.2 Bioatividade

Devido a sua composição, os primeiros estudos sobre *Spirulina* sp. possuíam foco em seu valor nutricional (DENG; CHOW, 2010), sendo seu consumo motivado por seu alto valor proteico e riqueza de nutrientes. Porém, atualmente, essa cianobactéria tem cada vez mais se caracterizado por exercer efeitos terapêuticos devido a sua alta bioatividade. Isso porque, além dos macros e micronutrientes anteriormente citados, *Spirulina* sp. é fonte de diversos compostos bioativos, os quais incluem ficobiliproteínas, diferentes clorofilas e carotenoides, compostos fenólicos, compostos com atividade antimicrobiana (PLAZA *et al.*, 2009) e antiviral. Segundo Wu *et al.* (2016) alguns dos principais compostos bioativos presentes nessa microalga são: ficocianina,  $\beta$ -caroteno, polissacarídeos sulfatados, ácido  $\gamma$ -linolênico e sulfolipídeos (WU *et al.*, 2016).

Dentre as diversas propriedades terapêuticas exercidas pela *Spirulina* sp. e seus componentes, destacam-se suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória, características abordadas em diversas revisões (DE MORAIS *et al.*, 2015; DENG; CHOW, 2010; FINAMORE *et al.*, 2017; VO; NGO; KIM, 2015; WU *et al.*, 2016). Graças a tais propriedades, a cianobactéria e seus compostos bioativos possuem potencial aplicação no tratamento e prevenção de problemas de saúde, principalmente aqueles derivados de processos oxidativos e inflamatórios, como: diabetes (NASIRIAN *et al.*, 2018), artrite (ALI; BARAKAT; HASSAN, 2015), esteatose hepática (PAK *et al.*, 2012), hipercolesterolemia (COLLA; MUCCILLO-BAISCH; COSTA, 2008) e até mesmo câncer (AKAO *et al.*, 2009; CZERWONKA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2005).

A ingestão oral é uma das práticas mais realizadas em que se notam tais efeitos da biomassa de *Spirulina* sp. Foi relatada a capacidade da microalga de

combater anemia e imunossenescência de idosos. O estudo foi realizado em voluntários com mais de 50 anos diagnosticados com anemia e submetidos a uma dieta suplementada com *Spirulina* sp. por 12 semanas (SELMI *et al.*, 2011). A alimentação suplementada com *S. platensis* também apresentou efeito quimioprotetivo, agindo contra toxicidade e carcinogênese induzidas por dibutilnitrosamina em fígado de rato (ISMAIL *et al.*, 2009). Igualmente agiu contra toxicidade sub-aguda do pesticida deltamantina, demonstrando atividade protetora hepática, renal e cerebral (ABDEL-DAIM *et al.*, 2016) e também protegeu o fígado de ratos contra toxicidade de metotrexato, uma droga utilizada para doenças carcinogênicas, inflamatórias e autoimunes (KHAFAGA; EL-SAYED, 2018).

Deng e Chow (2010) e Wu *et al.* (2016) fornecem excelentes revisões sobre os efeitos hipolipidêmico, antioxidante, imunomodulador e anti-inflamatório da microalga. Apesar de o entendimento dos mecanismos de ação ainda ser limitado, segundo os autores, os principais compostos ativos responsáveis pelas ações antioxidante e anti-inflamatória são os pigmentos ficocianina e  $\beta$ -caroteno.

O  $\beta$ -caroteno é o principal carotenoide presente na *Spirulina* sp. e contribui para a proteção contra peroxidação de lipídeos, sendo considerado um antioxidante de membranas eficiente (DE MORAIS *et al.*, 2015). Em um estudo *in vivo*, a administração da biomassa de *S. platensis* dispersada em óleo como fonte de  $\beta$ -caroteno (200  $\mu$ M) foi realizada em ratos. Após 15 dias, os animais apresentaram um alto conteúdo do carotenoide no fígado. Além disso, apresentaram menor peroxidação lipídica e maiores níveis de enzimas antioxidantes, tanto no plasma quanto no fígado. Os resultados foram associados à atividade antioxidante do  $\beta$ -caroteno (RAO *et al.*, 2013).

Já a ficocianina é seu principal pigmento fotossintetizante, pertencente ao grupo das ficobiliproteínas. Esse grupo é majoritário no conteúdo proteico da *Spirulina* sp. São pigmentos solúveis em água e que compõem a maior parte da estrutura dos ficobilissomas presentes nas cianobactérias. Ficobilissomas são complexos proteicos que formam um dos sistemas responsáveis por captar luz, sendo componentes importantes para a realização de fotossíntese. Sua função é absorver a energia luminosa e transferi-la ao centro de reação do aparato fotossintético da alga, sendo, portanto, encontrados na superfície dos tilacóides (CHRISTAKI; BONOS; FLOROU-PANERI, 2015; FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; ROMAY *et al.*, 2003).

O funcionamento desse sistema deve-se às ficobiliproteínas. Elas são compostas por uma parte proteica, formada por dois tipos de polipeptídeos, e cromóforos, os quais são ligados de forma covalente por pontes tioéter em resíduos de cisteína (PADYANA *et al.*, 2001; PAGELS *et al.*, 2019). Esses cromóforos são chamados de ficobilinas, tetrapirrois de cadeia linear, e absorvem a luz em regiões do espectro em que a clorofila é menos eficiente. Existem diferentes classes de ficobiliproteínas, as quais se diferenciam por suas estruturas e características espectrais. São elas: ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina e ficoeritrocianina. Cada uma possui absorção máxima em faixas de comprimentos de onda distintas (PAGELS *et al.*, 2019), o que também as confere pigmentações diferentes. Na *Spirulina* sp., contudo, a principal delas é a ficocianina, pigmento cujo cromóforo, a ficobilina, é responsável por sua cor azul intensa.

Devido a suas propriedades, a ficocianina é um produto atrativo comercialmente, sendo *Spirulina* sp. sua principal fonte de produção (MORANÇAIS; MOUGET; DUMAY, 2018). As espécies mais utilizadas para esse fim são *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. Ainda que outras microalgas sejam eventualmente aplicadas para a produção desse pigmento, *Spirulina* sp. é preferida por ser um microrganismo bem conhecido e de vasta produção (MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

Devido a sua coloração azulada, a principal aplicação da ficocianina é como corante natural, substituindo pigmentos sintéticos, os quais muitas vezes são considerados tóxicos. Nesse sentido, é utilizada na indústria de alimentos, como por exemplo, em balas, drinks e bebidas lácteas, e de cosméticos. Outra característica interessante é a sua capacidade de emitir fluorescência (em 640 nm) quando extraída do aparato fotossintético. Tal atributo permite que ela seja utilizada como biomarcador fluorescente em análises laboratoriais, com aplicações em microscopia fluorescente, ensaios imunológicos e diagnósticos (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

Contudo, o que mais tem se destacado recentemente em relação a essa ficobiliproteína é a sua bioatividade. A ficocianina possui alta capacidade antioxidante e anti-inflamatória, o que torna esse pigmento atrativo no setor farmacêutico e clínico (MORANÇAIS; MOUGET; DUMAY, 2018). Tais características a colocam como alvo em estudos para a prevenção e tratamento de diversas doenças causadas por estresse oxidativo e inflamações severas, demonstrando

resultados positivos em modelos *in vitro* e *in vivo* (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014). Dessa forma, é considerada um potencial componente para o desenvolvimento de alimentos funcionais e medicamentos.

A ficocianina possui a habilidade de inibir radicais peroxila (KANNAUJIYA *et al.*, 2019), diminuir a produção de nitrato e inibir a peroxidação lipídica (DENG; CHOW, 2010). Ela exibe efeitos anti-inflamatório, neuroprotetor, imunomodulador, anticâncer e antiangiogênico (ALI; BARAKAT; HASSAN, 2015).

Seu potencial neuroprotetor é uma das características mais relevantes. Pré-tratamentos oral e intranasal com o pigmento foram capazes de proteger o cérebro isquêmico de modelos animais através da inibição do estresse oxidativo, restaurando o balanço oxidante/pro-oxidante, e também atenuando a deterioração de astrócitos por espécies reativas de oxigênio (ROS) (MIN *et al.*, 2015; PENTÓN-ROL *et al.*, 2011). A ficocianina também se mostrou capaz de reduzir atrofia no timo de ratos induzida por tributiltina, composto utilizado como plastificante, pesticida e preservativo, mas com potencial tóxico. O tratamento dos animais com o pigmento atenuou o estresse oxidativo no timo e modulou a produção de ROS e glutathione peroxidase (GUPTA; DWIVEDI; KHANDELWAL, 2011).

Além dos pigmentos, polissacarídeos produzidos pela *Spirulina* sp. também apresentam efeitos terapêuticos, especialmente anti-inflamatório (SENNI *et al.*, 2011) e seu mecanismo de ação básico se dá pela estimulação e modulação de macrófagos (DE MORAIS *et al.*, 2015). Também são tidos como um dos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana e antiviral da cianobactéria (BROWN *et al.*, 2014; DE MORAIS *et al.*, 2015; KARKOS *et al.*, 2011).

Como anteriormente citado, *Spirulina* sp. também é conhecida por fornecer ácidos graxos essenciais, sendo o principal o ácido  $\gamma$ -linolênico. Seu uso na medicina é importante, uma vez que, no corpo humano, é precursor de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, atuando na redução da pressão sanguínea, no metabolismo lipídico e nas respostas inflamatórias e imunológicas do organismo (ABED; DOBRETISOV; SUDESH, 2009; HAMED, 2016). Além disso, os ácidos graxos possuem papel importante na atividade antimicrobiana de *Spirulina* sp. Em um extrato metanólico, tal ação foi atribuída à presença de ácido  $\gamma$ -linolênico (DE MULE; DE CAIRE; DE CANO, 1996), enquanto em um estudo feito com extração supercrítica, essa função é relacionada com um efeito sinérgico dos

ácidos graxos presentes, principalmente os ácidos láurico, palmítico e oleico (MENDIOLA *et al.*, 2007). Diferentes tipos de solventes já foram testados e os respectivos extratos de *Spirulina* sp. mostraram comportamentos divergentes, atuando na inibição de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*), Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) e levedura (*Candida albicans*) (EL-SHEEKH *et al.*, 2014; KUMAR; BHATNAGAR; SRIVASTAVA, 2011; MALA *et al.*, 2009; OZDEMIR *et al.*, 2004). Essa característica torna-se relevante por ser uma alternativa ao uso de antibióticos, cujo uso desenfreado resultou no surgimento de cepas patogênicas resistentes.

Uma classe de compostos bioativos que podem surgir com a hidrólise da biomassa de *Spirulina* sp. são os peptídeos. Tratam-se de fragmentos de proteínas que, devido a sua sequência de aminoácidos, apresentam algum tipo de atividade biológica, podendo atuar de forma positiva no metabolismo e saúde humana (SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017). Estudos realizados *in vitro* relatam peptídeos derivados de *Spirulina* sp. com atividades antioxidante (SANNASIMUTHU *et al.*, 2018; SANNASIMUTHU; AROCKIARAJ, 2019), anti-inflamatória (VO; RYU; KIM, 2013), anticancerígena (SANNASIMUTHU *et al.*, 2019), hipotensiva e antidiabética (AIELLO *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019b).

Por fim, a cianobactéria *Spirulina* sp. também é relatada por produzir compostos fenólicos, os quais são considerados uma das mais importantes classes de antioxidantes naturais. Eles constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundários de plantas. Suas moléculas possuem um ou mais anéis aromáticos com pelo menos um grupo hidroxila, os quais são responsáveis pela sua bioatividade (CHRIST-RIBEIRO *et al.*, 2019; MACHU *et al.*, 2015), incluindo funções antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (KEPEKÇI; SAYGIDEGER, 2012). Machu *et al.* (2015) demonstraram a presença de catequina, epicatequina e pirocatecol em extrato aquoso de *S. platensis*, enquanto Machado *et al.* (2016) encontraram ácido gálico, ácido clorogênico e ácido protocatecuico em extrato metanólico. Além desses, também já foram reportados ácidos salicílico, trans-cinâmico, sinapínico, quínico e cafeico (DE SOUZA *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.*, 1998).

Devido a seus compostos bioativos, as microalgas também possuem funções na cosmetologia, sendo um tema revisado recentemente por Ariede *et al.*

(2017). Os autores citam a *S. platensis* como alga capaz de ser usada para proteção contra raios UV, devido ao seu sistema de proteção contra ROS e radicais livres. Mas seu potencial, tanto em cosméticos como na dermatologia em geral, é bem mais amplo está discutido na próxima seção.

### 2.1.3 Aplicações Dermatológicas

Atualmente existe uma crescente demanda, por parte dos consumidores, por produtos considerados mais seguros e sustentáveis, e isso reflete na escolha de produtos cosméticos. Nesse sentido, busca-se a aplicação de ativos derivados de fontes naturais, tanto para melhorar a aparência da pele quanto para tratar desordens cutâneas.

Organismos aquáticos são considerados boas fontes para o desenvolvimento de produtos dermatológicos devido a seus metabólitos secundários de grande valor, e isso inclui as cianobactérias, com aplicações em fotoprotetores, hidratantes e produtos antioxidantes e anti-inflamatórios (NOWRUZI; SARVARI; BLANCO, 2020). Dessa forma, devido a sua alta bioatividade, *Spirulina* sp. e seus compostos bioativos apresentam um grande potencial para aplicações dermatológicas.

Um dos seus efeitos mais relatados é a atividade antienvhecimento. O envelhecimento da pele é uma questão que traz preocupações, tanto pela perspectiva estética quanto clínica. Existem duas maneiras pelas quais a pele envelhece: uma é pelo efeito cronológico, processo natural que ocorre com o passar do tempo. A outra é através de agentes externos, dos quais a radiação ultravioleta B é a principal, o que leva ao que se chama de envelhecimento precoce (também denominada fotoenvelhecimento. Em ambos os casos, os mecanismos envolvidos, de maneira geral, levam ao mal funcionamento das células do tecido cutâneo, causando a degradação de componentes importantes para sua saúde e firmeza, efeito que se torna visível em sua superfície (MCCULLOUGH; KELLY, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2011).

O extrato proteico preparado a partir da biomassa de *Spirulina* sp. comercial mostrou sua capacidade de elevar níveis de expressão de proteínas receptoras de



fator de crescimento epidérmico (EGFR) e inibir a expressão de metaloproteinase 8 (MMP-8) em fibroblastos dérmicos humanos (HFDs), uma das enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular (ECM) (LIU *et al.*, 2018). Como consequência desses mecanismos, o extrato foi capaz de promover uma maior proliferação dos fibroblastos e os induziu a uma produção superior de colágeno. Outra descoberta interessante foi a inibição da enzima elastase, responsável pela degradação da elastina.

Outros estudos demonstram a ação da *Spirulina* sp. frente ao envelhecimento e danos provocados por radiação UVB. Lee *et al.* (2017) investigaram como o extrato etanólico de *S. platensis* protege fibroblastos dérmicos humanos irradiados por UVB. Os pesquisadores observaram que o pré-tratamento das células com o extrato inibiu danos no DNA causados pela radiação UVB. Através disso, o extrato diminuiu de forma significativa o arraste do ciclo celular e a senescência dos fibroblastos. Como resultado, um efeito anti fotoenvelhecimento é adquirido, uma vez que células senescentes aumentam a expressão de MMPs, levando à fragmentação de colágeno e destruição da ECM (LEE *et al.*, 2017).

Em 2018, um novo peptídeo foi obtido a partir do extrato proteico de *S. platensis* hidrolisado com tripsina. Esse peptídeo, de sequência Gli-Met-Cis-Cis-Ser-Arg, não apenas demonstrou atividade antioxidante, sendo capaz de proteger eritrócitos de peroxidação lipídica, como também mostrou-se hábil na estimulação da produção de colágeno (ZENG *et al.*, 2018). Fibroblastos de pele humana (HSFs) submetidos a raio UVB foram posteriormente tratados com o hexapeptídeo. Como consequência, as células obtiveram uma maior taxa de sobrevivência e a concentração de colágeno encontrada no cultivo foi equivalente à do cultivo não irradiado.

Frente a esses resultados, os pesquisadores conduziram outro estudo com o hexapeptídeo, porém, dessa vez, passado pelo processo de acetilação e amidação (sendo chamado AAH). Nele, analisou-se seu efeito anti-fotoenvelhecimento *in vitro* e *in vivo*. Queratinócitos imortalizados humanos (HaCaTs) foram utilizados, seguindo o protocolo de exposição a raio UVB com posterior tratamento com o peptídeo modificado. O componente mostrou efeito proliferativo nas células danificadas maior que o controle positivo, o Matrixyl, ativo utilizado como agente anti-idade em cosméticos (ZENG *et al.*, 2019). Já no modelo *in vivo*, ratos irradiados tratados com AAH não apresentaram danos na pele. Através da análise histológica, observou-se

que o hexapeptídeo manteve aspectos saudáveis da pele frente aos raios UVB. Em adição, a avaliação bioquímica da pele dos animais demonstrou que, em relação ao grupo controle, AAH reduziu a quantidade de malondialdeído, um biomarcador de peroxidação lipídica, e inibiu a redução da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase). Também, assim como o extrato etanólico de *S. platensis* (LEE *et al.*, 2017), esse hexapeptídeo diminuiu a expressão de MMP-1 e MMP-3. Em todas as análises, a ação do AAH foi superior ao do controle positivo Matrixyl (ZENG *et al.*, 2019).

O consumo oral da biomassa de *Spirulina sp.* também exibe efeitos protetivos contra raios UVB, exercendo atividade antitumorigênica na pele de ratos através de suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Em um modelo *in vivo* camundongos suplementados com 10% de pó de *S. platensis* e ficocianobilina foram avaliados frente exposição à radiação UVB. Esses animais eram geneticamente modificados, sem conter o gene *Ogg1*, codificador de uma enzima de reparação para 8-oxoguanina (8-oxoG), um produto da lesão do DNA provocado por ROS gerada pela radiação UVB. Tumores de pele foram induzidos nos camundongos através da exposição crônica (três vezes por semana) ao raio UVB. Aqueles que eram suplementados com *S. platensis* apresentaram um retardo no desenvolvimento dos tumores com sete semanas de diferença, e nem todos os animais do grupo foram afetados, enquanto no grupo dos não suplementados, 100% da população apresentou tumor de pele (YOGIANTI *et al.*, 2014). Uma análise de exposição aguda à radiação também foi feita na orelha dos camundongos, a fim de avaliar a resposta inflamatória. A alimentação com a cianobactéria levou a um menor acúmulo de 8oxo-G no DNA epidermal, indicando baixa formação de ROS. Da mesma forma, a expressão de receptor tipo Toll 4, o qual é associado à tumorigênese na pele, foi inibida no tecido, levando à supressão das citocinas inflamatórias Cxcl1 e IL-1 $\beta$  (YOGIANTI *et al.*, 2014).

A ficocianina também teve seu efeito estudado na proteção contra a radiação UVB. Kim *et al.* (2018) realizaram o pré-tratamento de queratinócitos (HEK) e fibroblastos (HDF) (1-20  $\mu\text{g/mL}$ ) com a ficobiliproteína e observaram o aumento de heme-oxigenase-1 (HO-1) em níveis de mRNA e proteína de forma concentração e tempo-dependente em ambos os tipos celulares. HO-1 é uma importante enzima no combate do organismo contra o estresse oxidativo, com efeito antioxidantes e anti-inflamatórios. Além disso, a ficocianobiliproteína foi capaz de aumentar a expressão

de fatores antiapoptóticos enquanto diminui a de fatores pró-apoptóticos. Em adição, a condensação da cromatina e a fragmentação de DNA induzidos pela radiação UVB foram bloqueados pela adição de ficocianina às células. Esses resultados indicam a habilidade do pigmento em proteger células da pele do efeito apoptótico da radiação (KIM *et al.*, 2018).

Outro efeito interessante da *Spirulina* sp. é sua capacidade de inibir a enzima tirosinase, a qual é considerada enzima principal no processo de biossíntese de melanina. A regulação da atividade dessa enzima é alvo para o desenvolvimento de produtos com ação clareadora (MUKHERJEE *et al.*, 2018; SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019).

Dois estudos mostram como a *Spirulina* sp. pode agir de diferentes maneiras na inibição dessa enzima, seja por competição com o substrato, ou manipulando sua expressão. Isso devido a distintos componentes presentes em sua biomassa que desempenham funções variadas.

Um estudo mostrou o potencial do extrato de *S. platensis* como inibidor de tirosina. Tanto extrato aquoso quanto etanólico exerceram atividade inibidora de tirosinase de maneira dose-dependente, mas o etanólico foi mais eficiente. Através da análise de compostos fenólicos, observou-se que os dois solventes extraíram muitos compostos iguais, sendo ácido vanílico predominante. Contudo, o extrato etanólico apresentou de maneira exclusiva ácido cafeico e ferúlico. Esses resultados mostram que, provavelmente, o principal componente responsável pela ação anti-tirosinase dos extratos é o ácido vanílico. Além disso, a melhor ação do extrato etanólico foi atribuída a presença dos ácidos cafeico e ferúlico, uma vez que esses ácidos possuem estrutura similar a L-DOPA, competindo pelo sítio catalítico da enzima (SAHIN, 2018).

Já no outro estudo, a ação antimelanogênica da ficocianina foi investigada. Um tratamento com o pigmento foi realizado em células de melanoma de roedores. Com aplicação de 0,1 mg/mL, a atividade da tirosinase e o conteúdo de melanina nas células foram reduzidas em 13 e 15%, respectivamente. Exames moleculares evidenciaram que a ficocianina inibiu a expressão da tirosinase em níveis de mRNA e proteína, mostrando seu comportamento contra melanogênese através da atuação no maquinário celular (WU *et al.*, 2011).

Devido a seus componentes e bioatividade, *Spirulina* sp. possui um forte potencial de cicatrização e regeneração da pele, melhorando a proliferação e

migração de célula no local da lesão. Isso foi primeiramente demonstrado por Gur *et al.* (2013) em um estudo com análises *in vitro* e *in vivo* com extrato proteico de *S. platensis* e ficocianina. No ensaio de cicatrização de ferida *in vitro*, o qual consiste na realização de uma lesão em um cultivo celular, tanto o extrato quanto o pigmento mostraram aumentar a proliferação e viabilidade foi realizado de queratinócitos humanos (HS2), com diferenças pequenas. É possível perceber que a ficocianina é responsável em grande parte pela característica cicatrizando da *Spirulina* sp. Ainda assim, os resultados mais positivos do extrato indicam que a mistura de componentes nele presente atuam sinergicamente na proliferação das células da pele e conseqüente regeneração. Segundo o autor, minerais, ficobiliproteínas, vitaminas,  $\beta$ -caroteno, ácidos graxos, polissacarídeos, compostos fenólicos e voláteis seriam os responsáveis por acelerar a cicatrização, atuando como antioxidante e eliminando radicais livres na ferida, os quais são responsáveis pela morte celular (GUR *et al.*, 2013).

Em um ensaio de cicatrização de feridas, o extrato aquoso de *S. platensis* promoveu o aumento da migração celular de fibroblastos e o fechamento da ferida em 24 horas, com efeitos comparáveis ao do controle positivo alantoína. Compostos fenólicos e derivados de ácido graxo foram associados à atividade cicatrizante do extrato (SYARINA *et al.*, 2015).

Gunes *et al.* (2017) também avaliaram o efeito de cicatrização de ferida do extrato de *S. platensis*, contudo, incorporado em uma formulação de creme, com o mesmo tipo de ensaio de cicatrização. Após 10 dias de tratamento, ficou evidente que o creme adicionado do extrato promoveu maior proliferação e migração de fibroblastos no local de lesão. Enquanto a ferida tratada com apenas o creme obteve um fechamento de 33%, a adição do extrato de *S. platensis* (1,125%) proporcionou um fechamento de 74%. Ademais, o creme incorporado com o extrato também levou a uma maior produção de colágeno, fator importante para a regeneração da pele (GUNES *et al.*, 2017).

Liu *et al.* (2019) observaram que, em um cultivo de fibroblastos dérmicos humanos (CCD-986sk), o extrato proteico de *Spirulina* sp. estimula as células a saírem da fase G0/G1 para entrarem nas fases S e G2/M, o que indica a proliferação celular. Além disso, o extrato manifesta controle sobre o ciclo celular, aumentando a expressão de ciclinas, proteínas relacionadas ao processo, e reduzindo a expressão de p21 e p27, que são inibidores do ciclo celular. A via de sinalização PI3K/Akt, que

regula o ciclo celular e promove a proliferação, também foi estimulada pelo tratamento com o extrato de *Spirulina* sp. (LIU *et al.*, 2019).

O potencial cicatrizante de *Spirulina* sp. também se torna útil na engenharia de tecidos, em que sua biomassa pode ser incorporada a *scaffolds*. Essa abordagem permite tanto uma maior aderência e viabilidade das células à estrutura quanto uma redução de ROS no local, auxiliando o processo de regeneração do tecido (JUNG *et al.*, 2016, 2013; STEFFENS *et al.*, 2013, 2014).

A ficocianina mostra ter uma importante função nessa propriedade da *Spirulina* sp., uma vez que diversos estudos mostram seu poder cicatrizador de forma isolada, estimulando a migração celular e promovendo maior fechamento de ferida *in vivo* (MADHYASTHA *et al.*, 2008).

No contexto de aplicação dermatológica, o efeito antiviral de um polissacarídeo de *S. platensis*, denominado calcium spirulan (Ca-SP), chama atenção. Seu efeito inibitório apresenta grande potencial contra os vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) e herpes vírus humano tipo 8 (HHV-8), responsáveis pelo aparecimento de herpes labial e por lesões na pele do sarcoma de Kaposi, respectivamente. Mader e colaboradores estabeleceram o potencial desse polissacarídeo através de modelo *in vitro* e em estudo clínico. Em células queratinóticas (HaCaT), Ca-SP apresentou efeito inibitório de HSV-1 similar ao aciclovir (ACV), medicamento padrão utilizado para o tratamento de herpes simples. Em relação ao HHV-8, Ca-SP apresentou potente efeito antiviral, com IC50 menor que o da droga foscarnet, usada como controle positivo. A partir desses resultados, um creme contendo Ca-SP e extrato de *S. platensis* foi desenvolvido e testado para prevenção de herpes labial. O produto, aplicado em um modelo clínico, mostrou eficiente atividade profilática. Pessoas com histórico da doença utilizaram o creme para evitar a exacerbação do vírus frente a um procedimento de maquiagem de lábios permanente. Sua eficácia foi maior que o tratamento tópico padrão com ACV (MADER *et al.*, 2016).

Como anteriormente apresentado, *Spirulina* sp. demonstra uma efetiva atividade antimicrobiana, porém, sua capacidade antibiofilme apresenta-se ainda mais interessante pelo potencial de tratar infecções crônicas e persistentes em feridas de pele. O extrato metanólico de *S. platensis* apresenta inibição de biofilme de bactérias de interesse clínico: *S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. hydrophila*, *V. alginolyticus*, *C. violaceum* e *V. parahaemolyticus*. Também se

mostrou eficiente na redução de hidrofobicidade da superfície celular e da formação de EPS, fatores cruciais para a formação de biofilmes (LEWISOSCAR *et al.*, 2017).

Boutin *et al.* (2019) avaliaram a ação de extratos lipídicos de *S. platensis* sobre a formação de biofilme da levedura *Candida albicans*. Extratos com alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, sendo ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido linoleico majoritários, mostraram alta atividade de inibição de crescimento de biofilme da levedura (BOUTIN *et al.*, 2019).

Uma das características mais evidenciadas da *Spirulina* sp. é sua propriedade anti-inflamatória. Tal característica torna-se interessante para inflamações crônicas, um dos maiores desafios da dermatologia. A dermatite atópica e psoríase são exemplos de doenças inflamatórias com importância pública e de prevalência crescente. Seus sintomas costumam denegrir a qualidade de vida dos pacientes, levando à alteração da barreira cutânea prejudicada, coceira, insônia, e até estigma social (SHIN *et al.*, 2017).

Apesar de não haver estudos que relacionem diretamente *Spirulina* sp. ou algum de seus compostos bioativos com essas doenças, seus potenciais anti-inflamatório e anti-histamínico merecem ser explorados dermatologicamente. Sendo *Spirulina* sp. uma fonte natural e consumida de forma segura, a ideia de utilizá-la para o tratamento de inflamações e prurido na pele é válida

A ficocianina é considerada principal componente responsável pela atividade anti-inflamatória da *Spirulina* sp. Ramirez *et al.* (2002) mostram que através da ingestão de ficocianina, camundongos com orelhas sensibilizadas com ovalbumina obtiveram uma menor reação alérgica. O grupo tratado com a proteína exibiu inibição tanto do edema quanto da atividade da enzima mieloperoxidase, um importante biomarcador de inflamação. Os autores verificaram que a ficocianina age inibindo a liberação de histamina, mediador de inflamação, pelos mastócitos (REMIREZ; LEDÓN; GONZÁLEZ, 2002).

A ação anti-histamínica da *Spirulina* sp. também foi relatada. A mortalidade de ratos pré-tratados com a cianobactéria (0,01-1000  $\mu\text{g/g}$ ) frente injeção do composto 48/80 (indutor de liberação de histamina) foi inibida de maneira dose-dependente. De fato, os níveis de histamina no sêrum dos animais reduziram significativamente com o tratamento (KIM *et al.*, 1998). Da mesma forma, peptídeos obtidos a partir da hidrólise de *S. máxima* também exibiram habilidade de inibir a degranulação de mastócitos (VO *et al.*, 2018).

A ficocianina também se mostrou efetiva na redução de inflamação através da aplicação tópica, o que seria interessante para um uso mais localizado na pele. Estudos apontam atividade inibitória de inflamação tópica induzida por óleo de algodão e ácido araquidônico em orelha de rato (MANCONIA *et al.*, 2009), e éster de forbol na pele das costas de rato (CASTANGIA *et al.*, 2016b). Foi mostrado que a aplicação da proteína foi capaz de reduzir o edema e reduzir a atividade de mieloperoxidase. Apesar de existirem diversos mecanismos pelos quais a ficocianina promove tais resultados, os autores apresentam a relação da atividade antioxidante do pigmento, capaz de eliminar ROS e radicais livres nas células submetida ao estresse, diminuindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios (CASTANGIA *et al.*, 2016a, 2016b).

Por fim, em vista das diversas aplicações que *Spirulina* sp. e seus componentes possuem na dermatologia, uma melhora do aspecto geral da pele pode ser esperada pela sua utilização. Em um estudo realizado com poloneses consumidores de suplementos de microalgas, avaliou-se que, daqueles que se suplementavam com *Spirulina* sp., a melhora da qualidade da pele foi o segundo efeito benéfico mais frequente. Os autores afirmam que tal benefício é plausível devido ao valor nutricional da microalga (RZYMSKI; JAŚKIEWICZ, 2017).

Já em um estudo clínico, esses aspectos podem ficar mais evidentes. Delsin *et al.* (2015) avaliaram a eficácia clínica a longo prazo de uma formulação cosmética contendo extrato de *Spirulina* sp. O estudo foi realizado tanto em pele jovem (voluntárias com 18-39 anos) quanto em pele madura (40-65 anos), com aplicação duas vezes ao dia na face de um gel creme contendo 0,1% de extrato seco de *Spirulina* sp. Após 28 dias aplicando o produto contendo o ativo, observou-se o aumento do conteúdo de água no estrato córneo e redução da perda transepidérmica de água em ambos os tipos de pele. Esse efeito pode ser atribuído a rica composição da cianobactéria em aminoácido e polissacarídeos, os quais melhoram a barreira da pele. Também houve uma redução da produção de sebo, o que foi atribuído aos ácidos graxos do extrato, capazes de inibir a enzima responsável pelo metabolismo de testosterona na pele. Ademais, a rugosidade na superfície da pele foi reduzida devido à hidratação promovida pelo creme, o que da mesma forma levou a uma distribuição mais uniforme e homogênea de queratinócitos na pele das voluntárias. Todos esses fatores indicam os multibenefícios da *Spirulina* sp. para a saúde da pele (DELSIN *et al.*, 2015).

Posteriormente, um estudo mais prolongado foi realizado com a incorporação do extrato de *Spirulina* sp. em uma formulação de protetor solar. Juntamente com a adição de dimetilmetoxi cromanol (DMC), o extrato teve o intuito de acrescentar um efeito antioxidante ao produto, melhorando a fotoproteção da pele. Voluntárias entre 30 e 50 anos em um ensaio unicego testaram o protetor solar com ou sem os antioxidantes por 84 dias. A adição de tais componentes, de fato, melhorou a densidade dermal e propriedades mecânicas da pele, possivelmente devido a eliminação de ROS e menor degradação do colágeno. Além disso, a formulação suplementada com os antioxidantes promoveu a redução de pontos mais escuros na pele e aumentou sua elasticidade líquida. A adição do extrato de *Spirulina* sp. e DMC melhoraram significativamente os aspectos da pele comparado à formulação fotoprotetora sozinha, mostrando, clinicamente, o potencial da cianobactéria não somente para melhorar a pele, mas também em auxiliar na fotoproteção (SOUZA *et al.*, 2017).

#### 2.1.4 Potencial Prebiótico

A microbiota humana tem sido cada vez mais objeto de estudo. Sua importância para a saúde humana vem sendo consolidada de tal forma que essa comunidade de microrganismos simbióticos já é considerada um “órgão humano”, sendo parte inerente do nosso organismo (BAQUERO; NOMBELA, 2012).

A microbiota do corpo humano é constituída por mais de 100 trilhões de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus, que vivem tanto sobre a pele quanto no interior do organismo (WANG *et al.*, 2017). Estima-se que a proporção de células microbianas para células humanas em nosso corpo seja próxima de 1:1. Porém, sob a perspectiva genética, a quantidade apenas de genes bacterianos presentes no corpo corresponde a aproximadamente 100 vezes a quantidade de gene humano (GILBERT *et al.*, 2018). Apesar da enorme complexidade que isso representa na saúde humana, sabe-se que mudanças nessa microflora e em seu metabolismo são relacionadas a diversas doenças, uma vez que ela interage de certa forma com os sistemas do corpo humano (GILBERT *et al.*, 2018). O



desequilíbrio na constituição ou proporção desses microrganismos chama-se disbiose.

Apesar da enorme variedade de comunidades microbianas contidas em uma única pessoa, como da pele, oral, vaginal, pulmonar e intestinal, esse último local é o mais conhecido e explorado nos últimos anos. O intestino é o maior exemplo da interação entre microbiota e hospedeiro. No ser humano, seu interior é colonizado por cerca de  $10^{14}$  de microrganismos distribuídos em milhares de espécies. O equilíbrio desse ecossistema é de extrema importância para o bom funcionamento do órgão e de todo o organismo, tendo papel central no sistema imune e proteção contra patógenos. Quando em disbiose, todo esse sistema sofre com inflamações, sendo muito relacionado a doenças inflamatórias, distúrbios gastrointestinais e problemas relacionados ao sistema nervoso central (SANNASIMUTHU *et al.*, 2020).

Nesse contexto, probióticos e prebióticos são termos cada vez mais conhecidos e aplicados na área da saúde. A Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) define que probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício saudável ao hospedeiro” (HILL *et al.*, 2014). Até hoje, probióticos existentes no mercado são voltados apenas à saúde intestinal (humana ou animal), sendo comercializados na forma de alimentos, suplementos ou remédios.

Já o termo “prebiótico”, por muito tempo foi destinado a componentes não digeríveis e fermentáveis por bactérias específicas do intestino, que seriam capazes de gerar algum benefício fisiológico ao hospedeiro. A partir disso, foram consolidados os efeitos prebióticos de oligossacarídeos, os quais são conhecidos por aumentar a população de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino. Contudo, hoje o conceito expandiu e, conforme a ISAPP definiu em 2016, prebiótico é “um substrato que é utilizado seletivamente pelos microrganismos do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde” (GIBSON *et al.*, 2017). Dessa forma, não há mais limitações quanto: ao local de aplicação, que pode ser outro além do intestino, atuando em microbiotas da pele e vaginal, por exemplo; às bactérias benéficas, não sendo somente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; e ao tipo de componente, que, além dos conhecidos oligossacarídeos, pode ser ácido linoleico conjugado, ácidos graxos poli-insaturados, compostos fenólicos e fitoquímicos (GIBSON *et al.*, 2017).

Apesar de ainda poucos, estudos evidenciam o potencial da *Spirulina* sp. como prebiótico. Tais investigações, porém, limitam-se ao desenvolvimento de

alimentos lácteos e à modulação da microbiota intestinal em animais. Provavelmente isso decorre do fato da importância desse tema ainda estar em ascensão, assim como o intestino permanece sendo o local mais explorado.

Um dos primeiros estudos realizados relacionando *Spirulina* sp. com probióticos investigou a capacidade do meio de crescimento da cianobactéria de estimular o crescimento de *Lactococcus lactis* e outras bactérias ácido lácticas (BALs). Tal meio é rico em exopolissacarídeos produzidos pela microalga. Ao ser adicionado ao meio padrão de cultivo de BALs, MRS (de Men Rogosa & Sharpe), aumentou-se consideravelmente o crescimento de todas as cepas estudadas (PARADA, 1998). Em outro estudo *in vitro*, a eficiência da biomassa de *S. platensis* foi estudada para o crescimento de *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* em meio sintético. Uma suspensão da biomassa em três concentrações (1, 5 e 10 mg/mL) foi adicionada ao meio MRS com as culturas bacterianas. Na maior concentração, após 10 horas de incubação, a biomassa de *S. platensis* foi capaz de aumentar o crescimento das três respectivas cepas em 145,90%, 171,67% e 185,84%. De forma interessante, ao mesmo tempo em que a cianobactéria estimula o crescimento das LABs, ela também exerce efeito antibacteriano contra microrganismos patogênicos (BHOWMIK; DUBEY; MEHRA, 2009).

Muitos outros estudos fazem uso dessa propriedade da *Spirulina* sp. para estimular o crescimento e a viabilidade das bactérias probióticas fermentadoras em produtos alimentícios. No leite bovino, *S. thermophilus*, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* e *L. lactis* subsp. *lactis* foram cultivadas com uma suspensão de *S. platensis* (3 mg/mL). O dobro da concentração (6 mg/mL) também foi testado para *L. lactis* e *L. acidophilus*. Em ambos os casos, as bactérias cresceram mais rápido no leite com a cianobactéria em comparação ao leite sem sua adição, com um incremento de até 27,3% para *L. lactis* em 6 mg/mL (DE CAIRE *et al.*, 2000). Em adição, a incorporação de *S. platensis* em leite bovino também mostrou-se capaz de estimular o crescimento e produção de ácido por culturas *starters* do gênero *Lactococcus* (MOLNÁR; GYENIS; VARGA, 2005) e pela bactéria probiótica *L. plantarum* (GYENIS *et al.*, 2005).

Quando adicionada a produtos fermentados, além de promover um melhor crescimento das bactérias responsáveis pela fermentação, *Spirulina* sp. aumenta sua viabilidade durante o armazenamento, importante característica para produtos

contendo probióticos. Em leite fermentado com *L. acidophilus*, *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus thermophilus* (cultura ABT, Christian Hansen), a suplementação com a cianobactéria permitiu a maior viabilidade das cepas após 18 dias de armazenamento a 15 °C. Em especial, a bactéria *S. thermophilus* obteve uma viabilidade maior ao final do período comparado ao valor inicial (dia 0). Sob um período maior de 42 dias a 4 °C, a tendência de valores maiores no leite suplementado com *S. platensis* no armazenamento se manteve. Dessa forma, sua biomassa apresentou uma influência positiva sobre a cultura ABT (VARGA *et al.*, 2002).

A mesma tendência pôde ser observada em estudos posteriores. Guldás e Irkin (2010) demonstraram a influência da adição de *S. platensis* no armazenamento (30 dias a 4 °C) de leite acidófilo (*L. acidophilus*), iogurte probiótico (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*) e iogurte natural (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*). A promoção de uma maior viabilidade das bactérias pela biomassa microalgal ocorreu em todas as cepas estudadas. Em especial, o probiótico *L. acidophilus* obteve um aumento de 3,1 log UFC/g no iogurte probiótico. Decorrente disso, os valores de pH dos três produtos atingiram valores menores com a *S. platensis* durante o armazenamento (GULDAS; IRKIN, 2010).

Já Beheshtipour *et al.* (2012) observaram a adição da cianobactéria tanto na fermentação quanto no armazenamento (28 dias a 5 °C) de um iogurte produzido com uma cultura *starter* de *L. acidophilus*, *B. lactis*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus* e *S. thermophilus* (cultura ABY, Christian Hansen). Durante a fermentação, os produtos contendo *S. platensis* demonstraram um aumento da contagem dos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis* de quase 2 log UFC/mL. Durante o armazenamento, a viabilidade dos probióticos no iogurte com a microalga também foi maior. Além disso, a adição de *S. platensis* levou a uma maior produção de ácido láctico pelas bactérias. Os autores inferiram que umas das razões para isso é seu efeito tamponante, decorrente das proteínas, peptídeos e aminoácidos, levando a um lento decaimento do pH e estimulando a acidificação das bactérias (BEHESHTIPOUR *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos com a incorporação de *S. platensis* para melhorar o crescimento e atividade bacteriana de uma bebida de iogurte denominada *ayran*, para a qual foram utilizados os mesmos microrganismos. Durante a fermentação, *B. lactis* foi o probiótico mais favorecido pela cianobactéria, mas após 21 dias de armazenamento (4 °C), todas as cepas

apresentaram um maior crescimento no ayran com *S. platensis* em relação ao ayran não tratado (ÇELEKLI; ALSLIBI; BOZKURT, 2019).

Tal efeito também se mostrou útil para melhorar a viabilidade de probióticos em queijos. A suplementação de queijo tipo feta com *S. platensis* promoveu a maior viabilidade, em relação ao controle, de *L. acidophilus* e *L. casei* em armazenamento por 45 e 60 dias, respectivamente (GOLMAKANI *et al.*, 2019; MAZINANI; FADAEI; KHOSRAVI-DARANI, 2016).

Como é possível observar, essas propriedades descritas da cianobactéria são predominantemente aplicadas a laticínios, produtos comumente utilizados como veículos para probióticos. Contudo, recentemente mostraram-se útil também para bebidas fermentadas a base de soja. Martelli *et al.* (2020) investigaram o potencial da biomassa esterilizada de *S. platensis* para impulsionar o crescimento de bactérias ácido lácticas e probióticos na fermentação de três substratos: caldo de soja tríptico (TSB), bebida comercial à base de soja (SBB) e leite em pó (SSM). Várias BALs selvagens, uma cepa probiótica (*L. rhamnosus*) e mixes comerciais foram utilizados. Os resultados evidenciaram que o efeito prebiótico e estimulador de BALs da biomassa varia de acordo com as cepas e substratos utilizados, uma vez que o comportamento das bactérias foi diferente entre o TSB e SSM. Ainda assim, de fato ocorreu um maior crescimento das cepas em ambas as matrizes com a incorporação de *S. platensis*, especialmente da *L. rhamnosus* no TSB. Já os mixes de culturas *starters* em SBB e SMM apresentaram comportamentos bem divergentes em relação à microalga, hora acelerando, hora reduzindo seu crescimento. Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliar para quais bactérias a *Spirulina* sp. seria vantajosa na fermentação de bebidas de soja (MARTELLI *et al.*, 2020a).

A partir desses estudos, pode-se concluir que, de fato, *Spirulina* sp. apresenta um grande potencial para estimular o crescimento de BALs e, de forma mais interessante, de bactérias probióticas. Isso a caracteriza como uma substância prebiótica. Evidenciam-se sua capacidade de reduzir o tempo de fermentação, promover a maior produção de ácidos e ainda aumentar a viabilidade das bactérias tanto durante a fermentação quanto durante o armazenamento.

Um dos principais fatores que contribuem para esse potencial, são os oligossacarídeos (presentes a forma de polissacarídeos), os quais são presentes nas microalgas de maneira geral (CAMACHO; MACEDO; MALCATA, 2019). E como demonstrado por Parada *et al.* (1998), os exopolissacarídeos produzidos por *S.*

*platensis* também exercem esse efeito. Esses componentes estimulam de maneira seletiva o crescimento e atividade de bactérias benéficas como os lactobacilos e as bifidobactérias (CAMACHO; MACEDO; MALCATA, 2019). Porém, além dos oligossacarídeos, à gama de nutrientes presente em sua biomassa também é atribuída a responsabilidade pela característica prebiótica. *Spirulina* sp. representa uma fonte única de componentes que sustentam e atendem às necessidades nutricionais de cepas probióticas, promovendo seu crescimento. Tais componentes incluem compostos nitrogenados como aminoácidos livres, peptona e peptídeos, adenina, hipoxantina, além de minerais e vitaminas, principalmente do complexo B (BEHESHTIPOUR *et al.*, 2013; ÇELEKLI; ALSLIBI; BOZKURT, 2019; GOLMAKANI *et al.*, 2019; GULDAS; IRKIN, 2010).

Assim, devido a sua composição, a cianobactéria *Spirulina* sp. torna-se um ótimo aditivo natural para a produção de produtos probióticos. Isso porque além de promover a viabilidade desses microrganismos, sua biomassa rica em compostos bioativos melhora significativamente as propriedades funcionais do produto, como por exemplo, seu caráter antioxidante (BARKALLAH *et al.*, 2017).

Ademais, sua utilização pode visar não apenas melhorar a qualidade dos fermentados aqui citados, mas também pode servir como ingrediente em fórmulas simbióticas, ou seja, que combinam probióticos e prebióticos, atuando na prevenção da disbiose. Em um estudo, *Spirulina* sp. foi investigada como um material para crioproteção de *Lactobacillus rhamnosus*, visando a maior viabilidade do probiótico após passar pelo processo de liofilização. Dentre várias substâncias que são comumente utilizadas (lactose, sacarose, lactulose e trealose) a *Spirulina* sp. apresentou o maior efeito positivo pela metodologia de superfície de resposta. Dessa forma, os autores afirmam que, além de manter a viabilidade do probiótico, a biomassa de *Spirulina* sp. acrescenta valor nutricional e propriedade simbiótica ao produto final (KORDOWSKA-WIATER *et al.*, 2011).

Segundo Finamore *et al.* (2017), *Spirulina* sp. pode ser útil para melhorar a saúde de humanos e animais através da modulação da microbiota intestinal, promovendo o crescimento de bactérias benéficas. Até o momento, contudo, estudos nesse sentido não foram realizados em humanos. Porém, encontramos na literatura relatos da modulação da microbiota intestinal em animais através da ingestão de sua biomassa ou extrato.

Levando em consideração o efeito da microbiota na saúde em geral do organismo, investigou-se se a ingestão de *S. platensis* por ratos idosos poderia modular a microbiota intestinal e, como consequência, diminuir a inflamação derivada da idade e desordens hepáticas. Após 6 semanas de suplementação com 5% de *S. platensis*, observou-se uma maior abundância relativa de *Roseburia* e *Lactobacillus* em relação ao grupo controle. Neste estudo, os autores inferem que a biomassa de *S. platensis* atua através da atividade antimicrobiana seletiva para outras bactérias, uma vez que a quantidade total de bactérias nas amostras diminuiu, enquanto as de *Roseburia* e *Lactobacillus* permaneceram as mesmas. Tal propriedade é exercida tanto por componentes derivados da *Spirulina* sp. como por peptídeos antimicrobianos produzidos pelo próprio hospedeiro, induzidos pela sua ingestão. Em paralelo, o melhoramento da imunidade do intestino foi observada, com ligação a uma menor inflamação no fígado obtida nos animais suplementados com a cianobactéria (NEYRINCK *et al.*, 2017).

Da mesma maneira, a ficocianina, demonstrou atuar sobre a fibrose pulmonar através de uma modulação do microbioma do intestino. Bleomicina foi utilizada para induzir a fibrose em camundongos, nos quais testou-se a ficocianina, administrando-se 50 mg/kg por dia. Segundo as análises, a intervenção com a bleomicina mudou significativamente a estrutura da microbiota intestinal dos animais. Porém, o tratamento com a ficocianina foi capaz de aumentar sua riqueza e diversidade, deixando-a mais parecida com o grupo controle. Famílias de bactérias que tiveram sua abundância reduzida (Muribaculaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Ruminococcaceae, Rikenellaceae, Akkermansiaceae e Bacteroidaceae) e aumentada (Erysipelotrichaceae, Helicobacteraceae, Staphylococcaceae) pelo fármaco, não sofreram os mesmos efeitos com a aplicação da ficobiliproteína. Também foi observado que o desenvolvimento da fibrose pulmonar aumentou os filos *Firmicutes* e *Proteobacteria* e diminuiu os *Bacteroidetes*, o que foi revertido pelo pigmento. A intervenção com a ficocianina também apresentou uma maior abundância de *Lactobacillus* em relação ao grupo não tratado, o que pode levar a uma maior imunidade. Assim, a associação entre a doença e a população bacteriana do intestino pôde ser observada (XIE *et al.*, 2019).

Esse estudo demonstra que, além dos componentes anteriormente citados, a ficocianina também apresenta um papel importante para a característica prebiótica da *Spirulina* sp. Ademais, os autores inferem que o efeito anti-inflamatório da

ficocianina pode estar relacionado com microbiota intestinal específica estimulada (XIE *et al.*, 2019).

Polissacarídeos extraídos de *S. platensis* (PSP) também foram estudados de maneira isolada. Eles foram testados em um modelo de constipação em ratos, aplicando-se 50, 100 e 200 mg por kg do peso do animal. A ingestão de PSP pelos ratos constipados mostrou um efeito purgativo, aumentando a frequência de defecação comparado ao modelo. Doses de 100 e 200 mg apresentaram efeito maior que o grupo controle positivo. Paralelamente, uma modulação significativa ocorreu na microbiota intestinal dos animais. A ingestão dos polissacarídeos de *S. platensis* promoveu o aumento de bactérias probióticas da família *Lactobacillaceae* assim como reconstituiu aquelas que haviam sido reduzidas pela indução de constipação, como as *Verrucomicrobia*. Além de elevar a abundância de *Lactobacillus*, também o fez para a bactéria probiótica *Akkermansia*, *Butyricimonas* e *Candidatus Arthromitus*, todas relacionadas a efeitos benéficos no intestino. Além disso, o grupo tratado com PSP apresentou a redução de bactérias patogênicas como as do gênero *Clostridium* (MA *et al.*, 2019).

Em outro estudo, analisou-se a modulação da microbiota intestinal em ratos provocada por uma pectina modificada extraída de *S. maxima*, assim como seu derivado nanoparticulado. Em ambos os grupos tratados com a pectina, um aumento de *Bacteroidetes* foi observado em relação ao controle, enquanto o nível de *Firmicutes* diminuiu. Famílias de bactéria abundantes foram Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Bacteroidaceae e Rikenellaceae. Além da modulação de tal microbiota, a suplementação com os derivados de pectina de *S. maxima* melhorou a expressão de genes do sistema imune e a morfologia do intestino (CHANDRARATHNA *et al.*, 2020).

Outra evidência da sua capacidade prebiótica da *Spiulina* sp. é obtida em abelhas. Justamente pela sua riqueza em polissacarídeos presentes em sua matriz extracelular, a biomassa de microalgas assemelha-se ao pólen, servindo de substrato para a fermentação da microbiota intestinal desses insetos (RICIGLIANO, 2020). Com uma dieta utilizando *S. platensis* como substituto do pólen, abelhas produtoras de mel obtiveram uma melhora significativa de sua microbiota intestinal. Seus efeitos prebióticos foram iguais ou excederam os do próprio pólen e de um substituto de pólen, promovendo o crescimento de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e

*Snodgrassella* (bactéria simbiótica específica de abelhas) (RICIGLIANO; SIMONE-FINSTROM, 2020).

Uma série de estudos evidencia o uso de extratos de *Spirulina* sp. na manutenção da saúde e da microbiota intestinal de ratos modelos de diabetes, os quais eram submetidos a uma dieta rica em gordura e açúcar. A ingestão do extrato etanólico de *S. platensis*, rico em ácidos graxos mostrou-se efetivo na melhora do metabolismo lipídico dos animais, concomitantemente a uma modulação da microbiota intestinal. A suplementação de 150 mg/kg/dia do extrato aumentou a abundância de bactérias benéficas como *Provetella*, *Barnesiella*, *Paraprevotella*, *Alloprevotella* e *Porphyromonadaceae*. Ao mesmo tempo, micróbios que foram positivamente correlacionados com níveis de triglicerídeos, colesterol e LDL-C, sofreram redução pelo uso do extrato da cianobactéria, sendo eles: *Turicibacter*, *Romboutsia*, *Phascolarctobacterium*, *Olsenella* e *Clostridium XVII* (LI *et al.*, 2018, 2019).

Em outro estudo, a ação dos extratos aquoso e etanólico foi avaliada. Enquanto os ratos que recebiam a dieta diabética, sem tratamento, apresentaram altos níveis de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes*, aqueles tratados com os extratos exibiram aumento de *Bacteroidetes*, com a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* mais próxima ao grupo que recebia uma dieta normal. De uma forma geral, observou-se que os tratamentos com ambos os tipos de extratos de *S. platensis* foram capazes de restaurar o balanço microbiológico da microbiota intestinal dos ratos, mesmo sob as condições de uma dieta rica em gorduras e açúcar. Bactérias benéficas dos gêneros *Oscillibacter* e *Parasutterella* foram privilegiadas com a microalga, enquanto as malélicas de *Turicibacter* foram reduzidas (WAN *et al.*, 2019).

A mesma tendência pôde ser observada com um hidrolisado de protease de *S. platensis* (SPPH), com a microbiota intestinal de ratos seguindo uma dieta indutora de obesidade divergente entre tratados e não tratados com SPPH. O hidrolisado, assim como os extratos, diminuiu a proporção de *Firmicutes* e aumentou a de *Bacteroidetes*, assim como diminuiu a presença de *Turicibacter* e *Clostridium XVIII* (HUA *et al.*, 2018).

Posteriormente, a ação conjunta desses extratos de *S. platensis* foi avaliada, em que o pó da cianobactéria passou por três modos de extração (95% etanol, 55% etanol e água) e posterior hidrólise com protease. A junção dessas extrações formou



um mix de substâncias ativas, denominado SPMX. Durante 8 meses de tratamento, o grupo tratado com o SPMX obteve uma ascendência de bactérias benéficas no intestino como *Prevotella*, *Bifidobacterium* e *Roseburia*, as quais foram reduzidas no grupo não tratado com a dieta rica em gordura. Ao mesmo tempo, bactérias consideradas maléficas (*Porphyromonadaceae*, *Barnesiella*, *Clostridium XIVa*, *Turicibacter*, *Pseudoflavonifractor*, *Flavonifractor* e *Paraprevotella*) cresceram nos animais não tratados, o que não aconteceu com os tratados, indicando que o extrato misto de *S. platensis* exerceu um efeito regulatório da microbiota (CHEN *et al.*, 2019).

Resultados similares foram reproduzidos em um estudo mais recente, porém com o uso do pó de *S. platensis*. A ingestão da biomassa igualmente mostra a capacidade de reverter os efeitos provocados por uma dieta rica em gordura. Enquanto a dieta promoveu um aumento na abundância dos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* e redução de *Bacteroidetes*, o uso de *S. platensis* foi capaz de restabelecê-los aos níveis normais (YU *et al.*, 2020b).

Sua propriedade prebiótica também a torna vantajosa como suplemento alimentar na pecuária. Alguns estudos indicam que sua adição na dieta de animais modula de alguma forma sua microbiota intestinal. Em frangos de corte, a suplementação com 0,25-1,0% de *Spirulina* sp. aumentou a contagem de *Lactobacillus* no ceco de forma dose-dependente. Os autores hipotetizam que a manutenção dessas bactérias benéficas esteja relacionada ao aumento de digestibilidade e do desempenho de crescimento das aves, como também à redução da excreção de gás amônia (PARK; LEE; KIM, 2018). Suínos tratados com *Spirulina* sp. apresentam uma redução no quadro de diarreia, o que pode ser resultado da homeostase intestinal, com o crescimento seletivo de colônias microbianas comensais (FURBEYRE *et al.*, 2018). A suplementação com *S. platensis* também mostrou-se positiva em aves de codorna, reduzindo a contagem de coliformes e *Staphylococci* e aumentando a contagem de probióticos e *Streptococci* na porção ileocecal (YUSUF *et al.*, 2016).

Igualmente, o uso da cianobactéria prebiótica possui potencial na aquicultura. Quando suplementado em camarões (*Litopenaeus vannamei*), observou-se uma maior diversidade bacteriana no intestino médio dos animais, o que foi associado a uma melhor imunidade e proteção antiviral (PILOTTO *et al.*,

2019). Já em peixe esturjão, a suplementação com *S. platensis* levou a um aumento dose-dependente da contagem de BALs (ADEL *et al.*, 2016).

Um estudo recente identificou que a administração de *Spirulina* sp. por animais saudáveis também exerce esse efeito modulador. Com a ingestão de 1,5 ou 3,0 g/kg por dia, ao final de 25 dias a riqueza microbiana de camundongos não foi alterada, mas sua composição sim. Inclusive, divergências foram observadas entre as diferentes doses administradas. Efeitos mais benéficos foram observados pela ingestão da maior dose (3,0 g/kg), incluindo a redução da relação entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Além disso, três gêneros (*Barnesiella*, *Bacteoides*, *Flavonifractor*), os quais foram encontrados em abundância no ceco dos animais tratados com alta dose, foram relacionados a marcadores saudáveis como redução de apetite, atenuação de estresse oxidativo e melhora do perfil lipídico (HU *et al.*, 2019a).

De forma resumida, pelos estudos realizados em animais, conclui-se que a ingestão de *Spirulina* sp. ou de seu extrato exerce um efeito benéfico na composição da microbiota intestinal do organismo, atuando como prebiótico. Hu *et al.* (2019a) ressalta que, diferente de outros prebióticos conhecidos, os quais possuem uma estrutura específica e seletiva para certas bactérias, *Spirulina* sp. é um organismo constituído de vários potenciais prebióticos. Isso porque tal característica pode ser atribuída não somente aos seus polissacarídeos, mas também a compostos como a ficocianina, ácidos graxos poli-insaturados e polifenóis (GIBSON *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2019a; LI *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2019)

O que se observa é que, mesmo sob condições adversas de dieta ou até de doenças, a administração de *Spirulina* sp. permite manter a homeostase da microbiota intestinal e promove o crescimento de bactérias benéficas, assegurando um bem-estar geral do organismo. Um dos pontos a se destacar e que é observado em alguns estudos aqui citados é sua capacidade de manter a relação *Firmicutes/Bacteroidetes* próxima a de grupos considerados saudáveis, enquanto tal relação era aumentada nos animais doentes ou afetados negativamente de alguma outra forma (CHANDRARATHNA *et al.*, 2020; HUA *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2020b). Esses dois filós são os mais abundantes no intestino, e essa relação é um importante indicativo do equilíbrio da microbiota, sendo seu aumento associado a diversas condições patológicas (MAGNE *et al.*, 2020).

Diante desse potencial, outras possibilidades de uso de *Spirulina* sp. permanecem inexploradas, visto a vasta variedade de microbiotas existentes no organismo humano. Uma das que têm ganhando destaque atualmente é a microbiota da pele, cujo equilíbrio é essencial para manter a integridade da barreira cutânea, dentre outros aspectos saudáveis desse órgão. Assim, esse local torna-se interessante para investigação da ação prebiótica de *Spirulina* sp.

## 2.2 PRÉ E PROBIÓTICOS NA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e a primeira barreira física do nosso organismo com o meio ambiente. Assim como o intestino, ela abriga milhões de microrganismos que possuem funções importantes na sua proteção, imunidade e quebra de produtos naturais (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018), sendo parte inerente do órgão e essenciais para o desempenho de sua função como barreira. Assume-se que a máxima densidade bacteriana na superfície da pele seja em torno de  $10^6$  células por  $\text{cm}^2$ . Contudo, a distribuição entre nichos diferentes do corpo não é uniforme e pode variar entre  $10^2$  e  $10^6$  células/ $\text{cm}^2$  (EGERT; SIMMERING; RIEDEL, 2017).

Essa microbiota em equilíbrio é mandatória para a saúde da pele, portanto, quando alterada por fatores endógenos ou exógenos, pode levar a condições inflamatórias na pele, como infecções, alergias e até doenças autoimunes (DRÉNO *et al.*, 2016). Nessa relação simbiótica, o corpo humano fornece um habitat para colonização, enquanto os microrganismos contribuem com a defesa e regulação do sistema imune (MUSTHAQ; MAZUY; JAKUS, 2018; SFRISO *et al.*, 2020).

Devido à grande extensão desse órgão, a pele apresenta um estrutura microbiana extremamente variada em diferentes locais, e que depende de características físico-químicas e topográficas (GILBERT *et al.*, 2018). As diferenças no tipo de pele, tanto entre partes do corpo em uma mesma pessoa, quanto entre diferentes indivíduos, apresentam uma forte relação com a microbiota, que é distinta para cada um. Essas diferenças interindividuais se devem a fatores como idade, alimentação, gênero e região geográfica (MUSTHAQ; MAZUY; JAKUS, 2018).

Apesar dessa grande variedade na composição de microrganismos, alguns gêneros de bactérias são predominantes, sendo eles *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* (HOLZ *et al.*, 2017).

Como já citado, o equilíbrio do microbioma da pele é de extrema importância para a manutenção de uma barreira cutânea saudável. Se por algum motivo sua estrutura é modificada, podem ocorrer inflamações, coceira, escamações, entre outros sinais clínicos (SFRISO *et al.*, 2020). A disbiose geralmente acarreta na perda de diversidade microbiana, levando a um domínio maior de microrganismos específicos. Na pele, esse desbalanço afeta sua homeostase, além de ocorrer o crescimento dominantes de patógenos, pode ser afetada também pela perda de interações com microrganismos benéficos (NAKATSUJI; GALLO, 2019). Dessa forma, algumas doenças como dermatite seborreica, acne, dermatite atópica e rosácea são relacionadas a mudanças do microbioma cutâneo (GRICE; SEGRE, 2011; SCHOMMER; GALLO, 2013).

Algumas bactérias da microbiota auxiliam na proteção da pele, interagindo com o sistema imune do hospedeiro e evitando a reprodução de patógenos. Segundo Dréno *et al.* (2016), a microbiota da pele representa uma espécie de filtro, uma vez que a maioria dos componentes e outros microrganismos que entram em contato com a pele também entram em contato com seus microrganismos. Além disso, a disbiose cutânea também pode levar ao crescimento exacerbado de um microrganismo comensal que, dessa forma, pode causar alguma patologia. Alguns fatores que podem impactar a microbiota cutânea são terapias anti-inflamatórias, lavagem excessiva, antibióticos, radioterapia e quimioterapia.

Dito isso, em termos de microbiota, uma pele saudável pode ser caracterizada como aquela que possui uma grande diversidade de bactérias comensais e benéficas. Já uma pele não saudável apresenta uma redução dessa diversidade associada a um aumento do número absoluto de microrganismos patógenos, ou seja, uma pele em estado de disbiose (EGERT; SIMMERING; RIEDEL, 2017).

*Staphylococcus aureus* certamente é umas das bactérias patogênicas mais estudadas nesse ramo, causando graves infecções cutâneas e muitas vezes sistêmicas. Ela pode ser adquirida tanto em ambiente hospitalar ou na comunidade. O maior desafio no tratamento de infecção por essa bactéria é a existência de cepas resistentes à antibióticos, conhecidas como *Staphylococcus aureus* resistente à

meticilina (MRSA). Além disso, sua capacidade de formar biofilmes aumentam sua virulência e resistência (GLATTHARDT *et al.*, 2019). Assim, muitos estudos buscam métodos terapêuticos que relacionam a microbiota humana à proteção contra a infecção desse patógeno. De forma interessante, ela pode ser encontrada na pele de indivíduos saudáveis sem causar problemas, contudo, a partir do momento em que ocorre uma ruptura no balanço de microrganismos na pele, seu super crescimento pode ocorrer (DRÉNO *et al.*, 2016).

Dentre as bactérias comensais que ajudam a manter a estabilidade da microbiota, impedindo o crescimento de patógenos, destacam-se *S. epidermidis* e *Cutibacterium acnes*, que estão entre as espécies mais encontradas na pele humana. Ambas possuem a capacidade de fermentar fontes de carbono presentes na pele e, a partir disso, produzir ácidos graxos de cadeia curta com propriedades antibacterianas (SCFA).

O estudo conduzido por Shu *et al.* (2013) mostrou que *C. acnes* fermenta glicerol, produzindo SCFA como ácido propiônico, acético e láctico. Como consequência, demonstrou reduzir o crescimento de uma cepa MRSA. *In vivo*, tanto a aplicação tópica do fermentado quanto de *C. acnes* com glicerol reduziu a contaminação pelo patógeno em feridas na pele (SHU *et al.*, 2013). A produção de SCFA por *C. acnes* também auxilia na manutenção da acidez da pele, o que também representa um mecanismo de proteção contra patógenos (GRICE; SEGRE, 2011).

Já a bactéria *S. epidermidis* é mais estudada nesse sentido. Ela representa mais de 90% da microbiota aeróbia e exerce efeitos benéficos ao hospedeiro de maneira a contribuir para seu sistema imune e para a função da barreira (PRESCOTT *et al.*, 2017).

A fermentação de glicerol pela bactéria comensal *S. epidermidis* é relatada por produzir SCFA com atividade antimicrobiana contra o crescimento de *C. acnes* em lesões de acne (WANG *et al.*, 2014). Um desses SCFAs produzidos, o ácido butírico, também mostrou ter ação anti-inflamatória contra exposição crônica a radiação UVB. Em um modelo *in vivo*, a fermentação de *S. epidermidis* reduziu o nível de IL-6 e o engrossamento da epiderme, além de melhorar a recuperação das lesões causadas pela irradiação (KESHARI *et al.*, 2019).

Uma fração (<10kDa) do sobrenadante de uma cultura de *S. epidermidis* mostrou capacidade de induzir a expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs),

em especial a  $\beta$ -defensina, em queratinócitos. Em experimento *in vivo*, essa fração foi injetada intradermicamente em camundongos e, após serem infectados com *Streptococcus* do grupo A (GAS), os animais apresentaram significativamente menos lesões infecciosas que o grupo controle, além de menor sobrevivência de GAS no local (LAI *et al.*, 2010).

Modulinas solúveis em fenol (PSMs) produzidas por *S. epidermidis*, com características parecidas com a de AMPs produzidos pelo hospedeiro, também possuem a habilidade de inibir o crescimento de GAS, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *E. coli*. Essas PSMs agem através da ruptura das membranas das bactérias, matando esses organismos (COGEN *et al.*, 2010). Com essa ruptura, também há o estímulo da produção de AMPs pelo próprio hospedeiro, o que é crucial para a redução dessas bactérias (DRÉNO *et al.*, 2016).

A proteína serina protease produzida por algumas cepas de *S. epidermidis* consegue destruir biofilmes de *S. aureus*, incluindo cepas resistentes, transformando-as da forma séssil para planctônica (IWASE *et al.*, 2010).

Outras moléculas presentes no meio de cultivo de *S. epidermidis* mostraram reduzir tanto a formação de biofilmes de *S. aureus* quanto os biofilmes já existentes (GLATTHARDT *et al.*, 2019). Além disso, bacteriocinas extraídas de seu citoplasma mostraram exercer atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e suas cepas resistentes a metilina (JANG *et al.*, 2020)

Outro produto produzido por *S. epidermidis*, o ácido lipoteicóico (LTA), possui papel importante na imunidade do hospedeiro. Esse produto é conhecido por ser um ligante de receptor TLR2. Através desse mecanismo, foi reportado que LTA consegue modular a resposta inflamatória de queratinócitos frente a uma lesão, diminuindo a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ , e auxiliando no processo de cicatrização (LAI *et al.*, 2009). Além disso, recruta mastócitos para a superfície celular e os induz a produzir o AMP catelicidina, auxiliando no combate de infecções virais (WANG; MACLEOD; DI NARDO, 2012). Da mesma forma, descobriu-se que um lipopeptídeo presente no meio de cultura de *S. epidermidis* exerce um efeito similar ativando TLR2 e, conseqüentemente, reduz os níveis de citocinas inflamatórias em lesões na pele (LI *et al.*, 2019).

Considerando a importância da microbiota cutânea, probióticos e prebióticos têm sido abordagens investigadas na dermatologia. E, apesar das evidências científicas sobre a atuação desses componentes serem ainda preliminares, vemos o

crescente uso desses termos na área cosmética, promovendo produtos para uma pele mais saudável (MUSTHAQ; MAZUY; JAKUS, 2018). A atuação de probióticos na microbiota da pele é estudada tanto pela aplicação de probióticos gastrointestinais, seja por via oral (devido ao eixo intestino-pele) ou tópica, ou pela aplicação tópica de bactérias consideradas probióticas da própria pele. Além disso, existem os pós-bióticos, que são subprodutos dos probióticos, obtidos a partir do seu cultivo. Podem ser extratos ou metabólitos específicos e também têm se mostrado benéficos à pele. A bactéria comensal que mais tem sido estudada nesse sentido é a *S. epidermidis*, sendo as vezes designada como um probiótico. Assim, estudos nessa área a utilizam como parâmetro de uma pele saudável.

Em um estudo *ex vivo*, células vivas e lisados do probiótico intestinal *Lactobacillus reuteri* foram aplicadas em um modelo de pele humana, a fim de testar suas propriedades anti-inflamatórias e de barreira. Ambos, lisados e bactérias vivas, exerceram efeito anti-inflamatório frente exposição a raios UVB em explante de pele e epiderme humana reconstruída (RHE), reduzindo os níveis de IL-6 e IL-8 nos modelos. Adicionalmente, na RHE, células vivas de *L. reuteri* e o lisado aumentaram a expressão gênica da aquaporina AQP3 e de laminina, respectivamente, o que contribui para a função de barreira (KHMALADZE *et al.*, 2019).

O filtrado da cultura de *L. rhamnosus* também foi proposto para uso em cosméticos. Isso porque, além de apresentar alta atividade antioxidante, o filtrado exerceu atividade inibitória da enzima tirosinase *in vitro*, indicando potencial clareador, e mostrou potencial capacidade de reter hidratação (TSAI *et al.*, 2013).

Holz *et al.* (2017) observaram que o extrato de *L. brevis* foi capaz de estimular o crescimento de *S. epidermidis in vitro*. A partir disso, um creme contendo o extrato foi aplicado em um estudo em humanos com xerose. Voluntários aplicaram o creme duas vezes ao dia na pele da canela por cerca de 28 dias. Após esse período, pode-se observar que o creme contendo o extrato de *L. brevis* promoveu o crescimento de bactérias comensais (*S. epidermidis*, *Micrococcus*, *S. capitis*, *S. xylosus*) na pele dos indivíduos. Em paralelo, a média de perda de água transepidermal diminuiu significativamente, assim como os sintomas de xerose dos pacientes.

Uma abordagem revisada por Huang e colegas (2020) é o uso de iniciadores de fermentação seletivos (SFIs), para a amplificação de bactérias probióticas na pele

e consequente combate a infecções. Os autores focam nas bactérias probióticas *S. epidermidis* e *C. acnes*, uma vez que, como já citado, são as duas bactérias mais abundantes no microbioma da pele e pela sua capacidade de fermentar o glicerol, produzindo SCFA. Sendo assim, os autores defendem que o uso desses prebióticos na pele representa uma solução potencial para a infecção por *S. aureus*, especialmente cepas resistentes a antibióticos (HUANG *et al.*, 2020). Alguns estudos testam essa abordagem para o tratamento de acne (MARITO; KESHARI; HUANG, 2020; WANG *et al.*, 2016).

Wang *et al.* (2016) demonstraram que a sacarose fomenta o aumento seletivo de *S. epidermidis*. Dessa forma, possibilita seu maior crescimento em detrimento da bactéria causadora de acne *C. acnes*. Observou-se que a sacarose estimulou a fermentação pela *S. epidermidis*, a qual converte glicerol em ácidos graxos de cadeia curta com ação antimicrobiana. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o uso de *S. epidermidis* juntamente com sacarose mostrou inibir *C. acnes* de modo mais efetivo do que na ausência de sacarose. Os ácidos graxos identificados da fermentação da sacarose foram ácido acético, butírico, láctico e succínico (WANG *et al.*, 2016). O mesmo mostrou ocorrer com laurato de polietilenoglicol (PEG-8), sendo considerado um potencial prebiótico para inibir o crescimento de *C. acnes* em lesões de acne. Os autores também propõe seu uso conjunto com antibióticos, a fim de aplicar uma menor concentração deles (MARITO; KESHARI; HUANG, 2020).

Lebeer *et al.* (2018) propõe a aplicação de lactobacilos vivos para o tratamento de acne. Os pesquisadores formularam um creme com as cepas de lactobacilos liofilizados (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*), sendo microencapsuladas. Com a aplicação de pressão no momento de passar o creme na pele, esses microrganismos seriam liberados e ativados. Pacientes com sintomas de acne passaram o creme duas vezes por dia ( $10^8$  UFC por aplicação) durante 8 semanas. Durante o tratamento, pode-se, de fato, observar a permanência e viabilidade de *Lactobacillus* na pele dos pacientes, a redução de sintomas da acne, além da menor formação de comedões (LEBEER *et al.*, 2018).

Em um estudo piloto, a aplicação de *S. epidermidis* liofilizada na pele foi avaliada. O método propôs uma abordagem personalizada, em que as cepas utilizadas eram isoladas dos próprios voluntários, e sua aplicação foi feita utilizando gel como base, duas vezes por semana. Após 4 semanas, o gel de *S. epidermidis* foi trocado por um gel placebo, e o estudo prosseguiu por mais 4 semanas. O uso do



gel com a bactéria individualizada promoveu um aumento de sua concentração na testa dos indivíduos em mais de 10 vezes. Já com a interrupção do uso, o número de *S. epidermidis* detectado reduziu gradativamente. Somado a isso, houve aumento do conteúdo de água e lipídeo e redução da evaporação da água na pele dos voluntários, fatores que levaram ao aumento de hidratação. Também, a aplicação de *S. epidermidis* levou a uma boa manutenção do pH baixo da pele através do aumento da produção de ácido láctico e propiônico (NODAKE *et al.*, 2015). Um estudo recente também demonstrou a possibilidade de modular a microbiota com a aplicação de microrganismos de outros indivíduos, sugerindo a ideia de transplante de microbiota (PAETZOLD *et al.*, 2019).

Apesar do avanço desses estudos, a definição de probióticos em cosméticos não é algo regularizado. O que vemos no mercado geralmente são produtos alegando conter probióticos, mas que na verdade possuem bactérias não viáveis, produtos de fermentação ou lisados de células. Em relação aos probióticos intestinais, como os lactobacilos, sabe-se da segurança para administração no organismo humano. Porém, em relação aos microrganismos comensais da pele, muitos estudos ainda são necessários para que se tenha garantia que a aplicação de células viáveis seja segura, visto que, dependendo do hospedeiro e do local de aplicação, a cepa pode vir a se tornar patogênica.

### 2.3 FERMENTAÇÃO COMO MÉTODO PARA AUMENTAR A BIOATIVIDADE

A fermentação é um dos métodos mais antigos utilizados para preservação de alimentos e para melhorar suas características organolépticas e nutricionais. Durante esse processo, ocorre uma série de transformações enzimáticas e químicas, as quais envolvem a quebra de substâncias orgânicas complexas em compostos mais simples e a conversão de compostos não ativos em ativos. Dessa maneira, texturas, aromas e sabores diferenciados são desenvolvidos e há um aumento da digestibilidade do alimento. Em adição, componentes produzidos na fermentação são responsáveis pela inibição do crescimento de patógenos (XIANG *et al.*, 2019). Dentre os alimentos fermentados mais conhecidos e produzidos, estão as bebidas alcoólicas, fermentadas por leveduras, e produtos à base de leite,

fermentados por bactérias ácido lácticas (BALs). Contudo, a variedade de produtos nesse ramo é enorme e inclui vegetais, grãos, frutas, carnes e peixes.

Submeter um alimento ao processo de fermentação permite sua transformação em um novo produto, o qual terá um maior valor nutricional e funcionalidades biológicas específicas. Isso porque a fermentação permite a geração de nutrientes mais biodisponíveis e de diversas substâncias bioativas (XIANG *et al.*, 2019). Dessa maneira, alimentos fermentados são conhecidos por promoverem saúde e bem-estar através da produção de compostos durante o processo como: antioxidantes, bioativos, vitaminas, ácidos graxos de cadeia curta e componentes anti-hipertensivos e antidiabéticos (MELINI *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a fermentação tem sido adotada como ferramenta não apenas para produzir alimentos, mas para produção e extração de compostos bioativos de diversas matérias primas, sendo uma alternativa interessante ao uso de solventes orgânicos tóxicos (MARTINS *et al.*, 2011). No contexto dessa aplicação, a fermentação se torna conhecida por aumentar a atividade biológica dos substratos e de seus extratos, principalmente a atividade antioxidante. Tal fenômeno decorre das biotransformações das moléculas presentes na biomassa assim como da quebra da parede celular de plantas, permitindo a liberação de diversos componentes (HUR *et al.*, 2014).

Como já citado, um dos tipos de microrganismos mais comumente utilizados e encontrados em fermentações são as BALs, principalmente para a produção de alimentos lácteos fermentados. Além de realizarem a síntese de moléculas bioativas, BALs hidrolisam polímeros e compostos bioativos do substrato (SEPTEMBRE-MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2018), fatores que levam ao aumento da bioatividade. Na fermentação de leite, por exemplo, ocorre a liberação de peptídeos bioativos através da quebra de proteínas inativas (ELFAHRI *et al.*, 2016).

Além da aplicação em laticínios, as BALs têm sido utilizadas para melhorar a bioatividade e concentração de compostos bioativos em extratos de frutas, plantas, ervas e grãos. Com esse processo, é possível aumentar a atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos totais, compostos organossulfurados e ácidos graxos de cadeia curta. Consequentemente, a fermentação vira uma ferramenta não apenas para melhorar a qualidade de alimentos e extratos, mas para produção de compostos de interesse farmacológico (Quadro 1).

**Quadro 1 - Aplicação da fermentação ácido láctica para aumentar a bioatividade de diversos substratos**

Substrato	Microorganismos aplicados	Características melhoradas pós-fermentação	Atividade farmacológica sugerida	Referência
Extrato aquoso de algas vermelhas ( <i>Gloiopeltis furcata</i> , <i>Chondrus elatus</i> )	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Atividade sequestrante do radical O <sub>2</sub> -		Takei et al. (2017)
Extrato aquoso de <i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Atividade sequestrante do radical O <sub>2</sub> -	Atividade anti-inflamatória intestinal	Nemoto et al. (2017)
Suco de <i>Momordica charantia</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta Conteúdo de compostos fenólicos totais Conteúdo de flavonóides Capacidade antioxidante Composição aromática		Gao et al. (2019)
Extrato de alho	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Conteúdo de compostos organosulfurados Atividade sequestrante do radical DPPH	Prevenção de doença hepática gordurosa não-alcoólica	Lee et al. (2017)
Extratos de ervas chinesas (carço de pêssego, casca de raiz de peônia, raiz de aspargo)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Poder de redução Atividade sequestrante do radical DPPH Conteúdo de compostos fenólicos totais Inibição de tirosinase	Ação clareadora da pele	Wang et al. (2016)
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Starmarella bombicola</i>	Atividade antibacteriana Atividade sequestrante do radical DPPH Atividade sequestrante do radical ABTS		Oh et al. (2017)
Purê de <i>Persea americana</i> Mill	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Atividade sequestrante do radical DPPH Conteúdo de compostos fenólicos totais Conteúdo de aminoácidos livres		Filannino et al. (2020)
Pólen de abelha	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus lactis</i>	Atividade sequestrante do radical DPPH Conteúdo de compostos fenólicos totais Conteúdo de flavonóides Atividade antimicrobiana		Kaškonienė et al. (2020)
Extrato de raiz de alçaçuz	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Atividade sequestrante do radical DPPH Conteúdo de compostos fenólicos totais		Mousavi e Mousavi (2019)
<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Atividade sequestrante do radical DPPH Conteúdo de compostos fenólicos totais Inibição da enzima tirosinase Atividade antibacteriana	Ação clareadora pela inibição de tirosinase e redução de melanina em cultivo celular Redução da produção de IL-6	Lee et al. (2020)

Substrato	Microorganismos aplicados	Características melhoradas pós-fermentação	Atividade farmacológica sugerida	Referência
Extrato de raiz de <i>Angelica dahurica</i>	<i>Bifidobacterium bifidu</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Atividade sequestrante do radical DPPH Poder de redução Conteúdo de compostos fenólicos totais	Ação clareadora pela inibição de tirosinase e redução de melanina em cultivo celular	Wang et al. (2017)
Extrato de <i>Saccharina japonica</i> Cevada	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Conteúdo de GABA (Ácido aminobutírico) Quantidade de $\beta$ -glucana Conteúdo de compostos fenólicos totais	Melhora da função cognitiva Inibe resistência à insulina Melhora perfil lipídico Ação anti-obesidade	Park et al. (2016, 2019) Zhang et al. (2016, 2019)
Feijão vermelho	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Conteúdo de GABA Inibição de ACE (enzima conversora da angiotensina)	Efeito antihipertensivo	Limón et al. (2015)
Extrato de <i>Lespedeza cuneata</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Atividade sequestrante do radical DPPH Atividade sequestrante do ROS Inibição de elastase Inibição de MMP-1 Indução da produção de procolageno tipo I	Efeito anti-envelhecimento da pele	Seong et al. (2017)
Extrato de <i>Cyclopia intermedia</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	Efeito antirrugas	Im et al. (2014)
Purê de brócolis	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Conteúdo de proteínas Conteúdo de compostos fenólicos totais Atividade sequestrante do radical ROO- Conteúdo de sulforafano		Cai et al. (2019)

**Fonte: Autoria própria**

Como pode-se observar no Quadro 1, a fermentação mediada por BALs possui a capacidade de melhorar a atividade biológica de diversos substratos. Os mecanismos pelos quais isso ocorre podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, contudo, a ação catalítica dos microrganismos possui função chave nesse processo.

Primeiramente, diversas enzimas hidrolíticas são responsáveis pela ruptura das paredes celulares das células, permitindo a liberação de compostos fenólicos, flavonóides e outros compostos bioativos no solvente (HUR *et al.*, 2014). Além disso, a ação enzimática é responsável pela biotransformação dos compostos ali liberados. O que se observa em muitos estudos é a mudança de perfil de compostos fenólicos entre o extrato fresco e o fermentado. Isso porque a fermentação promove a despolimerização de compostos fenólicos de alto peso molecular em fenólicos simples, e a conversão de glicosídeos na sua forma aglicona (HUR *et al.*, 2014; MOUSAVI; MOUSAVI, 2019), moléculas menores que são mais bioativas e

biodisponíveis que seus precursores. Enzimas como glicosídeos, tanases e esterases estão envolvidas nessa biotransformação (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

Segundo Filannino *et al.* (2020), ésteres de ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados de purê de abacate sofreram degradação por esterases e glicosil hidrolases de *L. plantarum*, resultando em um maior conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides, além de aumentar a atividade antioxidante. Avaliando o perfil de fenóis do purê, os ácidos hidroxicinâmicos ferúlico e sinapínico foram completamente metabolizados, não estando presentes após a fermentação. Ao mesmo tempo, a quantidade de ácido cafeico, elágico e epicatequina foi significativamente elevada. Da mesma forma, a quantidade de alguns compostos fenólicos do extrato de *Lespedeza cuneata* sofreu redução com a fermentação por *L. pentosus*, com exceção de quercitina e kaempferol, os quais aumentaram. Os autores alegam que houve a biotransformação desses compostos pela  $\beta$ -glucosidase microbiana. Enquanto a quercitrinina foi precursora da quercitina, juglanina foi precursora do kaempferol (SEONG *et al.*, 2017).

Além da biotransformação, outro mecanismo envolvido no aumento de conteúdo de fenólicos é a liberação de fenólicos livres anteriormente ligados a proteínas e à parede celular do substrato, tornando-os mais acessíveis (KHOSRAVI; RAZAVI; FADDA, 2020; ZHAO; SHAH, 2014).

Apesar de existir essa tendência do aumento do conteúdo de fenólicos com a fermentação, nem sempre isso ocorre, sendo seu nível mantido ou reduzido em algumas vezes. Porém, vale ressaltar que a atividade biológica de um extrato não depende apenas desse tipo de componente, sendo outros compostos ativos importantes para tal. A exemplo disso, temos a fermentação de blueberry a qual levou à redução de compostos fenólicos totais, antocianinas e flavonóides. Ainda assim, o extrato fermentado apresentou atividade antioxidante maior que o extrato não fermentado (OH *et al.*, 2017).

Em adição aos fenólicos, peptídeos bioativos também são responsáveis pela bioatividade do extrato fermentado. Nesse caso, as proteases do microrganismo quebram grandes moléculas de proteínas do substrato, que normalmente não possuem nenhuma bioatividade, em peptídeos e aminoácidos antioxidantes e com valor biológico (SEPTEMBRE-MALATERRE; REMIZE; POUCHERET, 2018). A quebra dessas ligações peptídicas promove a maior solubilidade desses compostos, o que, segundo Hur *et al.* (2014), aumenta a atividade antioxidante dos peptídeos.

Além de realizarem a conversão dessas moléculas, os microrganismos contribuem para a atividade biológica do extrato com seus próprios metabólitos. Portanto, metabólitos secundários, exopolissacarídeos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas antioxidantes contribuem significativamente para a bioatividade do extrato fermentado (XIANG *et al.*, 2019).

Fatores como pH e temperatura também são de extrema importância para a manutenção e aumento de bioatividade na fermentação. Isso porque eles irão afetar a estabilidade e atividade de componentes, como os fenólicos, e também são responsáveis, em parte, pela quebra da parede celular e consequente extração dos compostos do substrato (HUR *et al.*, 2014). Portanto, a redução de pH mediante a fermentação por BALs e a temperatura ótima de crescimento dessas bactérias facilitam o processo.

Claro que existem outros parâmetros que influenciam na fermentação e na bioatividade adquirida. São eles: espécie de microrganismo, solvente, tipo de substrato e tempo de fermentação (HUR *et al.*, 2014; OH *et al.*, 2017). Dessa forma, torna-se importante a investigação das condições necessárias para se atingir o objetivo esperado na aplicação da fermentação para extração e aumento da atividade biológica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Obter um extrato de *Spirulina platensis* bioativo com atividade prebiótica cutânea através da fermentação ácido láctica de sua biomassa.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a otimização da fermentação ácido láctica da biomassa de *Spirulina platensis* com *Lactobacillus acidophilus* variando tempo de fermentação, temperatura de incubação e quantidade de inóculo.

- Caracterizar os extratos obtidos da fermentação ácido láctica da biomassa de *Spirulina platensis* em termos de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

- Verificar a interferência dos extratos fermentados e não fermentados de *Spirulina platensis* no crescimento de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

Para a realização do trabalho, a biomassa de *Spirulina platensis* utilizada foi adquirida comercialmente. O formato de venda desse produto é feito em cápsulas preenchidas com 400 mg de biomassa seca em *spray dryer*.

A comercialização é realizada pela empresa brasileira Ocean Drop, a qual possui a indústria chinesa Fuqing King Dnarmsa *Spirulina* Co., Ltd. como fornecedor. Segundo a Ocean Drop, o fornecedor utiliza em seus cultivos água de fontes distantes dos centros urbanos e que é passada por um processo para a retirada de todos os elementos orgânicos e inorgânicos. O meio de cultivo possui nutrientes inorgânicos e é quimicamente definido. Além disso, nenhum tipo de agrotóxico ou pesticida é utilizado e os laudos apresentam não ter contaminação microbiológica e por metais pesados. A composição da biomassa de *S. platensis* comercializada pela Ocean Drop está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2 - Composição da *Spirulina platensis* comercializada pela Ocean Drop (valores para porção de 100 gramas)**

Componentes gerais	Quantidade	Nutrientes	Quantidade
Proteína	63,5 g	Vitamina B3	22 mg
Carboidratos	16,1 g	Vitamina B7	22 mg
Lipídeos totais	0,8 g	Vitamina B12	6 mcg
Gordura saturada	0 g	Ferro	123 mg
Fibras	0,7 g	Magnésio	305,2 mg
Minerais	0,6 g	Iodo	168 mg
		Carotenoides totais	451 mg

Fonte: Autoria própria

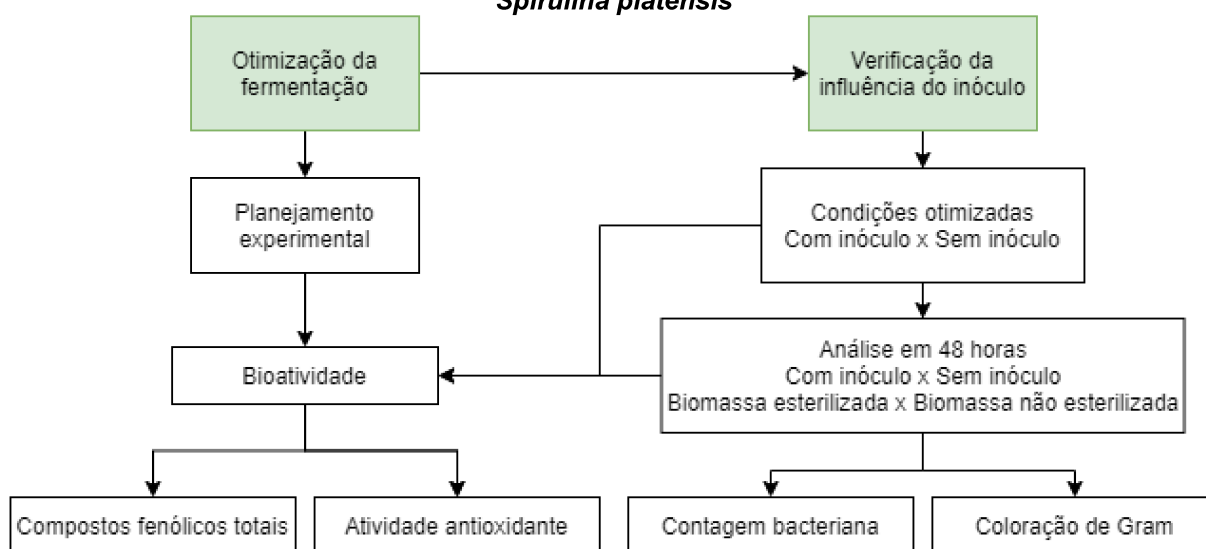
Dados coletados em < <https://qualidade.oceandrop.com.br/produtos/Spirulina#produto>>. Acesso em 09/09/2020



## 4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS FERMENTADOS DE *Spirulina platensis*

A produção de extratos para posterior avaliação de potencial prebiótico cutâneo consistiu em diversas etapas, buscando um extrato que apresentasse boa atividade biológica para auxiliar no potencial para aplicações cosméticas. A Figura 1 apresenta as etapas seguidas.

**Figura 1 - Fluxograma da metodologia aplicada para a produção de extratos fermentados de *Spirulina platensis***



Fonte: Autoria própria

### 4.2.1 Bactérias Ácido Lácticas

As cepas de bactérias ácido lácticas disponíveis para serem utilizadas nesse projeto foram *Pediococcus acidilactici* (CMBI-083) e *Lactobacillus acidophilus* (CMBI-085), as quais foram fornecidas pela Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR-PG. A partir de um pré-teste realizado com base nos valores de fenólicos totais e atividade antioxidante, optou-se por conduzir o estudo com a bactéria *L. acidophilus*.

As cepas acondicionadas em tubos eppendorf foram semeadas em placa de Petri com ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI) através do método de estriamento simples. As placas foram posteriormente incubadas em aerobiose estufa a 37 °C de um dia para o outro. A fim de obter uma colônia isolada, as culturas obtidas foram novamente semeadas por estriamento por esgotamento, levando-as à incubação

*overnight* a 37 °C. Colônias isoladas foram, então, transferidas para tubos inclinados com ágar BHI. Após incubação *overnight* a 37° C, os tubos foram mantidos em geladeira. As culturas eram repicadas a cada 15 dias para manutenção.

#### 4.2.2 Produção do Inóculo de *Lactobacillus acidophilus*

Para realizar a fermentação da biomassa de *Spirulina platensis*, o inóculo de *Lactobacillus acidophilus* foi produzido de forma padronizada. Efetuou-se a transferência de duas alçadas do tubo inclinado com a cepa para 25 mL de caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) em Erlenmeyer de 125 mL, o qual foi incubado em agitador tipo shaker (Incubadora Shaker com agitação orbital refrigerada, Solab) a 37 °C com rotação de 100 rpm por 24 horas. Após esse período, a densidade óptica em 600nm (DO<sub>600</sub>) foi verificada em espectrofotômetro (UV-M5 Visible Spectrophotometer, BEL Engineering srl), a fim de padronizar o inóculo para todos os ensaios. Buscou-se uma DO<sub>600</sub> equivalente a 1,4-1,5, a qual era comumente atingida nesse período de incubação. Em casos em que a densidade ultrapassasse 1,5, o inóculo era ajustado com água destilada (BAO *et al.*, 2018).

Para o primeiro planejamento experimental da fermentação, a inoculação foi realizada diretamente do frasco de inóculo para o frasco de inoculação. Já a partir do segundo planejamento experimental (incluindo os ensaios posteriores), o volume de inóculo foi centrifugado (Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific) a 3000 g por 10 minutos e ressuspendido em solução salina 0,9% (BAO *et al.*, 2018).

#### 4.2.3 Fermentação da Biomassa de *Spirulina platensis*

Cada ensaio de fermentação de *S. platensis* foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL da seguinte forma: 25 mL de água destilada esterilizada foram acrescidos do conteúdo de biomassa de *Spirulina platensis* de 3 cápsulas, equivalendo a 4% (p/v) do volume final. Posteriormente, o volume de inóculo determinado pelo planejamento experimental era adicionado e o volume final completado com água destilada para 30 mL. Os frascos eram, então, incubados na temperatura e pelo tempo determinados no planejamento experimental, sob agitação de 100 rpm.

#### 4.2.4 Otimização da Extração de *Spirulina platensis* Através da Fermentação Ácido Láctica com *Lactobacillus acidophilus*

A fermentação ácido láctica da biomassa de *Spirulina platensis* foi otimizada com o intuito de obter as melhores condições de extração para obtenção do extrato bioativo.

Inicialmente, a otimização da fermentação foi realizada com base em três fatores (variáveis independentes): quantidade de inóculo, tempo de fermentação e temperatura de incubação. Os valores foram inseridos no Software Statistica a fim de gerar um planejamento de experimentos do tipo composto central rotacional de dois níveis, mais pontos axiais e ponto central. Os níveis aplicados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Níveis dos fatores aplicados para a otimização da fermentação ácido láctica da biomassa de *Spirulina platensis***

Fatores	Níveis				
	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Inóculo (%)	-2,02994	1	5,5	10	13,02994
Tempo (h)	-0,11976	6	30	48	60,11976
Temperatura (°C)	20,96008	25	31	37	41,03992

Fonte: Autoria própria

Uma vez que o intuito da otimização era adquirir um extrato com boa atividade biológica, as variáveis dependentes analisadas foram o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

Após completar essa etapa, com base nos resultados obtidos, optou-se por realizar um novo planejamento experimental do processo de fermentação. Dessa vez, os fatores foram apenas inóculo e tempo, mantendo a temperatura fixa em 37 °C. Os níveis das variáveis estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Níveis dos fatores aplicados para o segundo planejamento experimental da fermentação ácido láctica da biomassa de *Spirulina platensis***

Fatores	Níveis				
	- $\alpha$	-1	0	1	+ $\alpha$
Inóculo (%)	0,85786	1	15	10	29,14214
Tempo (h)	-2,91169	6	48	48	0,85786

Fonte: Autoria própria

#### 4.2.5 Influência do Inóculo de *Lactobacillus acidophilus* na Extração de *Spirulina platensis*

A partir dos resultados obtidos nos planejamentos de experimentos, as melhores condições para obtenção de um extrato fermentado bioativo foram selecionadas e reproduzidas com e sem inoculação do *Lactobacillus acidophilus*. Assim, buscou-se verificar se a introdução da bactéria no processo de extração melhora a bioatividade do extrato em termos de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

As extrações foram realizadas como descrito na seção 4.2.3. Em Erlenmeyer de 125 mL, água destilada foi acrescida de 4% (m/v) de biomassa de *S. platensis*, 15% (v/v) de inóculo e posteriormente o volume foi completado para 30 mL com água destilada. No caso da extração sem *L. acidophilus*, o volume de inóculo foi substituído por água destilada. Os frascos foram incubados a 37 °C sob agitação de 100 rpm por 40 horas.

##### 4.2.5.1 Extração de *Spirulina platensis* com e sem inóculo de *Lactobacillus acidophilus* com biomassa esterilizada e biomassa não esterilizada

Levando em consideração os resultados da influência do inóculo de *Lactobacillus acidophilus* na extração de *Spirulina platensis*, foi considerada a possibilidade da interferência das bactérias associadas à biomassa da cianobactéria. Assim, novos ensaios foram executados avaliando também a extração da biomassa esterilizada em autoclave. Essa esterilização foi realizada a 121 °C por 15 minutos.

Os ensaios foram delineados da seguinte forma:

- I. Extração da biomassa esterilizada e não inoculada (E);
- II. Extração da biomassa esterilizada e inoculada (EI);

III. Extração da biomassa não esterilizada e não inoculada (NE);

IV. Extração da biomassa não esterilizada e inoculada (NEI).

Para esses ensaios, a concentração da biomassa de *S. platensis* permaneceu 4% (p/v). A quantidade de inóculo adicionado foi de 1% (v/v), uma vez que resultados do planejamento experimental mostraram que esse parâmetro possui pouca influência. A extração ocorreu a 37 °C em 100 rpm por 48 horas.

As amostras foram coletadas nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas e seus compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram analisados.

Nos tempos 0 e 48 horas também foi feita a determinação de concentração bacteriana de EI, NE e NEI através do método de contagem de colônias em placa pela técnica de microgota. Uma alíquota de 10 µL foi coletada de cada frasco e diluída em 90 µL de solução salina 0,9%. A partir disso, diluições sucessivas foram realizadas em microplaca de 96 poços, obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . De cada uma, 10 µL foram inoculados em placa de Petri contendo ágar BHI. Após incubação a 37 °C por 24 horas, as diluições que apresentaram entre 10 e 100 colônias foram contadas. O resultado, expresso em unidades formadoras de colônias por volume de amostra (UFC/mL), foi determinado considerando a diluição e volume da microgota dispersa.

Ao final do período das extrações, foi realizada coloração de Gram de amostras de todos os ensaios com o intuito de observar os microrganismos presentes.

#### 4.2.6 Obtenção dos extratos

Em cada ensaio realizado, após o tempo de extração, o conteúdo dos frascos foi centrifugado (Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific) a 2739 g por 15 minutos a 4 °C e posteriormente filtrado a vácuo (papel filtro qualitativo, 80 g/m<sup>2</sup>), sendo o filtrado o extrato final.

Os extratos foram mantidos em freezer (-20 °C) até o momento das análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Para o ensaio de ação prebiótica cutânea, os extratos passaram pelo processo de liofilização (Liofilizador L101, Liobras) por 24 horas.

#### 4.2.7 Tratamento estatístico

Para as análises de bioatividade envolvendo a comparação das diferentes extrações, foi realizado o tratamento estatístico dos dados a fim de avaliar se a diferença entre as médias seria significativa. Considerando um intervalo de confiança de 95%, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey com auxílio do Software Minitab.

#### 4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os extratos obtidos tiveram seu conteúdo de compostos fenólicos quantificados através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu, um dos métodos mais antigos aplicados para tal fim.

O ensaio se baseia na mudança de cor exercida pelo molibdênio presente no reagente Folin-Ciocalteu, que inicialmente é amarelo, frente à redução. Dessa maneira, na presença de agentes redutores, como compostos fenólicos, o estado de oxidação do Mo muda de 6+ para 5+, levando a formação de espécies de coloração azul. Tal coloração seria proporcional à concentração de fenóis, podendo ser detectado por espectrofotometria (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; LAMUELA-RAVENTÓS, 2017; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Esse ensaio, portanto, baseia-se na transferência de elétron, a qual mede a capacidade redutiva de um antioxidante, sendo esse um composto fenólico ou não. Contudo, apesar de não ser específico, seu resultado é normalmente expresso em termos de conteúdo de fenóis (LAMUELA-RAVENTÓS, 2017; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Primeiramente uma curva de calibração foi construída com ácido gálico. Para isso, diferentes concentrações de 20 a 200 mg/L de ácido gálico foram analisadas a partir da solução mãe de 200 mg/L. A partir dos resultados, uma curva padrão foi construída, correlacionando os valores de absorbância com concentração de forma linear.

A análise foi realizada segundo Granato e Nunes (2016). Em tubos de ensaio, foram adicionados 150 µL de amostra (sendo da solução de ácido gálico ou dos extratos diluídos 3 vezes em água destilada), 2400 µL de água destilada e 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos deixado em repouso, adicionou-se

300 µL da solução de carbonato de sódio 5% e os tubos foram agitados em vórtex e levados ao escuro. Após 1 hora de reação, foi realizada a leitura dos meios reacionais em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 725 nm (UV-M5 Visible Spectrophotometer, BEL Engineering srl). O mesmo procedimento foi feito para a confecção do branco, substituindo o conteúdo da amostra por água destilada.

Os valores de absorbância obtidos dos extratos foram aplicados na equação obtida da curva padrão de ácido gálico. Dessa maneira, o valor de compostos fenólicos totais foi expresso em ácido gálico equivalente por volume de amostra (mg AGE/L extrato).

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A fim de avaliar o potencial antioxidantes dos extratos fermentados, o ensaio de atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi aplicado. O DPPH é um radical livre estável devido a um elétron desemparelhado que se desloca por toda a molécula. Em sua forma radicalar, essa substância apresenta uma coloração roxa. Ao entrar em contato com um agente capaz de reduzi-lo, o DPPH perde sua cor roxa e torna-se um amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010). Sendo assim, a reação pode ser acompanhada através da espectrofotometria, em que a inibição do radical DPPH é representada pela perda de cor, que é proporcional à concentração de antioxidantes (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

Assim, os extratos das fermentações dos diferentes ensaios foram comparados em relação a % de inibição do radical DPPH. Para isso, 100 µL dos extratos diluídos 2 vezes em água destilada foram colocados para reagir com 3,9 mL de uma solução metanólica recém-preparada de DPPH (2,4 mg/100 mL) por 30 minutos em ambiente escuro. Após a reação, fez-se a leitura em espectrofotômetro (UV-M5 Visible Spectrophotometer, BEL Engineering srl) em comprimento de onda igual a 517 nm. A solução “branco” foi feita da mesma forma, sendo a amostra substituída por água destilada. (GRANATO; NUNES, 2016)

O cálculo para obtenção da % de inibição do radical DPPH é realizado de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100$$

Equação 1

#### 4.5 POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO DOS EXTRATOS DE *Spirulina platensis*

Os extratos de *Spirulina platensis* obtidos foram avaliados quanto ao seu potencial prebiótico em microrganismos da microbiota cutânea.

Assim, foi analisada a ação desses extratos sobre o crescimento das bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*.

##### 4.5.1 Bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*

As bactérias *Staphylococcus epidermidis* (INCQS00016) e *Staphylococcus aureus* (INCQS00039) foram doadas pelo Instituto Carlos Chagas (Fio Cruz) na forma liofilizada em ampolas de vidro. A reativação foi feita dispersando o conteúdo das ampolas em tubos contendo 10 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubando-os a 37 °C *overnight*. Colônias isoladas foram obtidas por semeadura por esgotamento em ágar (1,7%) com TSB as quais foram transferidas para tubos inclinados de TSA, também levados à incubação a 37 °C *overnight*.

Os tubos inclinados foram mantidos em geladeira e os cultivos eram repicados esporadicamente para manutenção.

##### 4.5.2 Produção de Inóculos de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*

Os inóculos das bactérias foram produzidos transferindo-se duas alçadas do cultivo de tubo inclinado para 25 mL de caldo TSB em Erlenmeyer de 125 mL, incubado a 37 °C por 16 horas. Cada cultivo foi, então, diluído 1:10 em caldo TSB e incubado em agitador tipo shaker (Incubadora Shaker com agitação orbital refrigerada, Solab) a 37 °C em 160 rpm por 2 horas, a fim de obter um cultivo mais fresco. Para o ensaio, os inóculos foram padronizados, sendo ajustados para uma OD<sub>600</sub> de 0,12 com solução salina 0,9% (DI LODOVICO *et al.*, 2020).



#### 4.5.3 Ensaio *in vitro* de Potencial Prebiótico Cutâneo

A análise foi realizada com base no trabalho de Lodovico e colaboradores (2020). Os efeitos de inibição bacteriana dos extratos E, EI, NE e NEI foram testados na concentração de 2,5% de extrato liofilizado diluídos em tampão fosfato salino de pH 7,2 (PBS). As soluções dos extratos foram esterilizadas por filtração (Filtro de seringa Minisart® 16534-K, poro 0,2 µm, Sartorius Stedim).

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 50 µL de extrato e 50 µL de inóculo. A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas. Amostras de 10 µL foram coletadas em 3 e 24 horas, sendo feita a contagem de UFC/mL seguindo os procedimentos descritos no tópico 4.2.5, mas utilizando TSA como meio de cultivo. Para o controle, o mesmo procedimento foi realizado, substituindo o extrato por PBS.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE *Spirulina platensis* ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO ÁCIDO LÁCTICA COM *Lactobacillus acidophilus*

A partir do software Statistica, o primeiro planejamento experimental foi delineado totalizando 17 ensaios experimentais. Os valores das variáveis de entrada do planejamento e as respostas das variáveis dependentes compostos fenólicos e atividade antioxidante estão apresentados na Tabela 5.

Os ensaios 5, 10 e 17 referem-se ao ponto central do planejamento, tendo sido realizado em triplicata. Os valores negativos, devido à inviabilidade de serem aplicados, foram considerados de valor zero.

**Tabela 5 – Matriz do primeiro planejamento experimental para a fermentação ácido láctica de *Spirulina platensis* com valores reais e as respostas compostos fenólicos totais e inibição de DPPH**

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Inóculo (%)	Fenólicos totais (mg AGE/L extrato)	Inibição DPPH (%)
1	12	25	1	582,52	45,59
2	12	37	10	743,95	54,15
3	48	25	10	834,74	67,96
4	48	37	1	865,00	56,68
5	30	31	5,5	771,58	60,77
6	12	25	10	772,89	62,39
7	12	37	1	725,53	55,84
8	48	25	1	734,30	57,13
9	48	37	10	912,37	56,61
10	30	31	5,5	773,33	63,55
11	-0,11976	31	5,5	440,44	39,11
12	60,11976	31	5,5	862,37	67,96
13	30	20,96008	5,5	740,44	59,73
14	30	41,03992	5,5	866,75	62,26
15	30	31	-2,02994	684,30	48,96
16	30	31	13,02994	782,54	70,17
17	30	31	5,5	766,75	62,71

Fonte: Autoria própria

A partir desses resultados, a regressão quadrática para cada variável dependente foi feita. O modelo matemático preditivo para a resposta de compostos fenólicos totais obteve um  $R^2$  igual a 0,742, enquanto o da inibição de DPPH obteve um  $R^2$  igual a 0,615. Os valores- $p$  de cada fator estão demonstradas na Tabela 6.

**Tabela 6 - Valores- $p$  de cada fator nos modelos matemáticos preditivos para as respostas de compostos fenólicos totais e inibição de DPPH**

Fator	valor- $p$	
	Compostos fenólicos totais (mg AGE/L)	Inibição DPPH (%)
Tempo (h)	0,000162	0,006691
Temperatura (°C)	0,040550	0,811036
Inóculo (%)	0,044834	0,013246

**Fonte: Autoria própria**

Os valores de  $R^2$  demonstram que os modelos matemáticos gerados não são precisos para prever o comportamento das respostas a partir das variáveis independentes escolhidas. Provavelmente os métodos de dosagem das variáveis dependentes sofram interferências por susceptibilidade à luz, temperatura ou até de outros componentes presentes nos extratos, levando a uma maior variação dos dados.

Ainda assim, considerando um intervalo de confiança de 95%, todas as variáveis dependentes mostraram-se significativas ( $p < 0,05$ ) para as respostas, com exceção da temperatura para a atividade antioxidante.

Contudo, vale observar que, apesar de significativas, as variáveis temperatura e volume de inóculo apresentaram um valor- $p$  muito próximo de 0,05 para os compostos fenólicos totais, indicando uma significância menor para essa variável dependente.

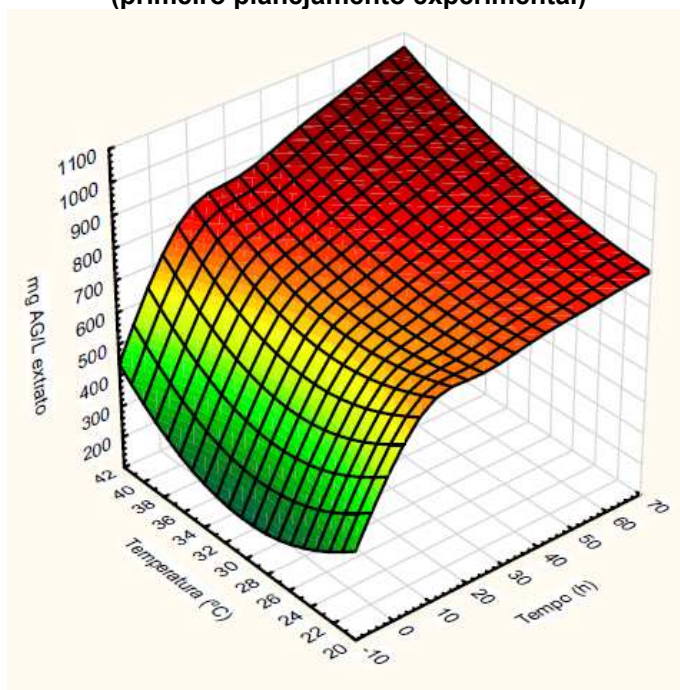
Uma melhor avaliação da influência dos fatores pôde ser feita com base nas superfícies de resposta geradas. Uma vez que os modelos gerados obtiveram coeficientes de determinação de valores baixos, as superfícies de respostas foram construídas pelo método dos mínimos quadrados ponderados.

Para os compostos fenólicos totais, à medida que o tempo de fermentação aumenta, é predito que sua resposta também é aumentada (Figura 2 e Figura 3), enquanto a temperatura mais elevada (a partir de 34 °C) apresenta uma influência positiva (Figura 2).

Na Figura 3 é possível observar como o volume de inóculo adicionado interfere pouco nos compostos fenólicos totais. Contudo, é interessante notar que no tempo 0 ou até negativo, há uma maior influência desse fator. Um mesmo tipo de comportamento é apresentado na Figura 4 em menores temperaturas de

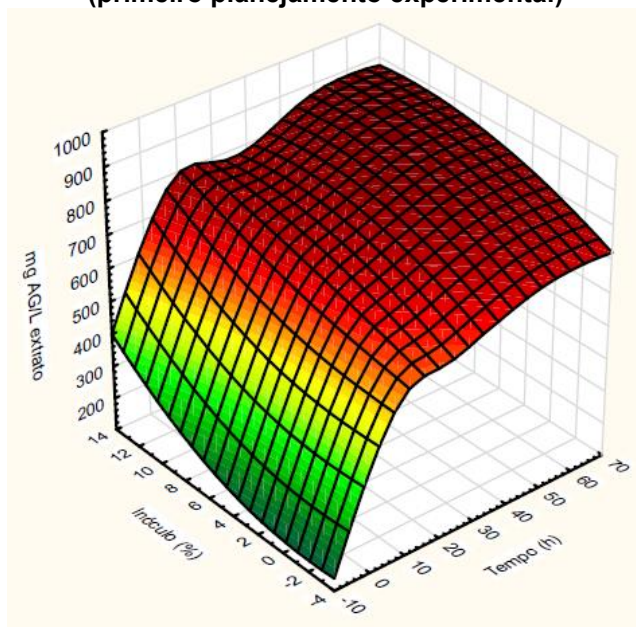
fermentação. Esse comportamento provavelmente decorre da interferência do meio de cultivo do inóculo, rico em compostos produzidos por *L. acidophilus*. Assim, quanto maior o volume de inóculo, mais meio de cultivo com componentes com atividade biológica eram adicionados. Dessa forma, mesmo em pouco tempo de extração, os extratos já apresentaram maiores conteúdos de fenólicos.

**Figura 2 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus tempo e temperatura (primeiro planejamento experimental)**



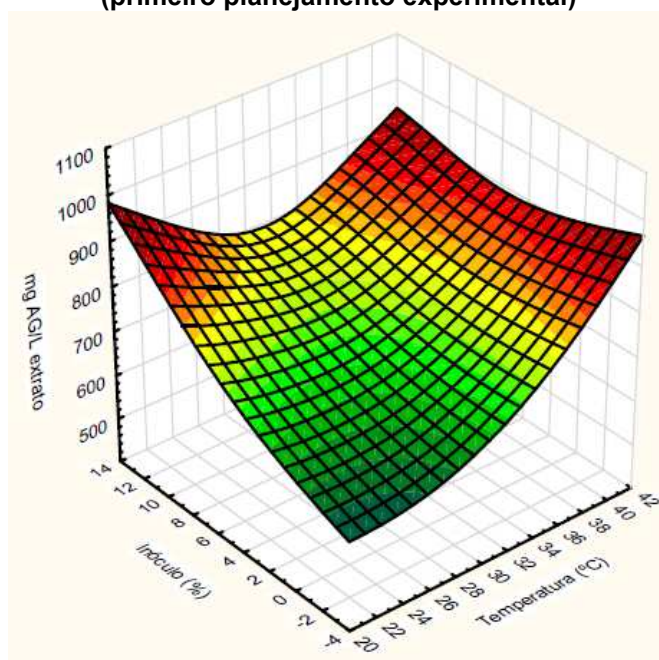
**Fonte: Autoria própria**

**Figura 3 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus tempo e inóculo (primeiro planejamento experimental)**



Fonte: Autoria própria

**Figura 4 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus temperatura e inóculo (primeiro planejamento experimental)**



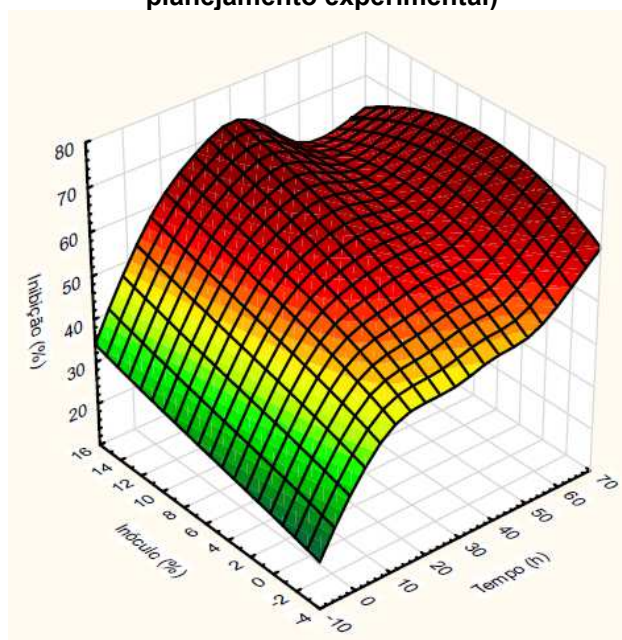
Fonte: Autoria própria

O mesmo tipo de comportamento pode ser observado nas superfícies de resposta da variável de inibição de DPPH. Com o aumento do tempo de fermentação, a tendência da capacidade antioxidante é aumentar (Figura 5 e Figura

6). Também, o inóculo apresentou influência positiva em tempos e temperaturas menores (Figura 5 e Figura 6) devido à interferência do meio de cultivo. Já a temperatura muito elevada (acima de aproximadamente 40 °C) mostrou ser prejudicial para a atividade antioxidante (Figura 5 e Figura 6), ainda que tal variável não tenha se mostrado significativa pelo modelo matemático.

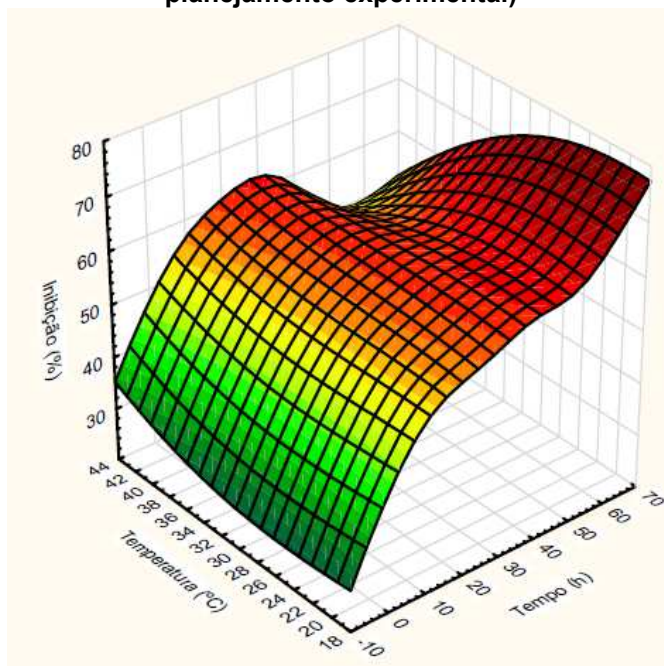
Um estudo da otimização do tempo e temperatura de extração para atividade antioxidante do extrato aquoso do cogumelo *Schizophyllum commune* obteve resultados semelhantes. A inibição do radical DPPH aumentou com o aumento do tempo de extração. Já o fator temperatura, entre 30 e 42,5 °C, promoveu um crescimento relevante da atividade antioxidante. Acima de 42,5 °C, porém, essa inibição decresce drasticamente (YIM *et al.*, 2013). Isso acontece pois o aumento da temperatura promove uma maior solubilidade dos compostos extraídos. Contudo, acima de determinados valores, ocorre a degradação de fenólicos e componentes antioxidantes sensíveis ao calor (CACACE; MAZZA, 2003), prejudicando a atividade biológica.

**Figura 5 - Superfície de resposta de inibição de DPPH versus tempo e inóculo (primeiro planejamento experimental)**



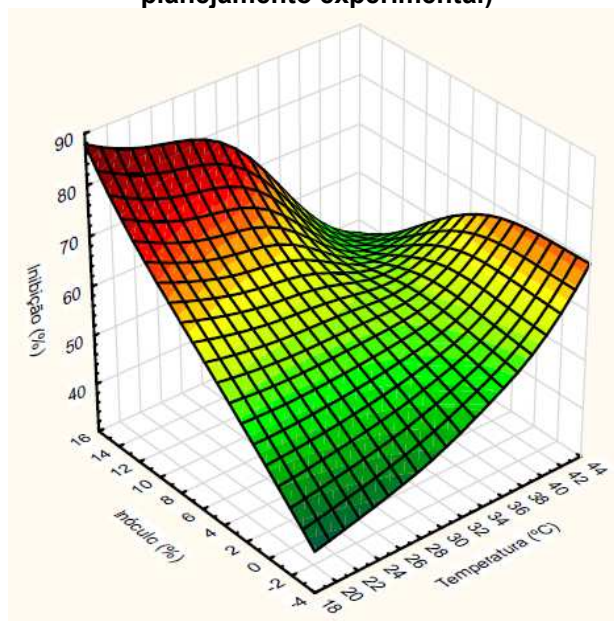
**Fonte: Autoria própria**

**Figura 6 - Superfície de resposta de inibição de DPPH versus tempo e temperatura (primeiro planejamento experimental)**



Fonte: Autoria própria

**Figura 7 - Superfície de resposta de inibição de DPPH versus temperatura e inóculo (primeiro planejamento experimental)**



Fonte: Autoria própria

A partir dessas análises, um novo planejamento experimental foi construído. Uma vez que a temperatura apresentou pouca influência em ambas as variáveis respostas, decidiu-se mantê-la fixa. As superfícies de resposta dos compostos



fenólicos totais predizem que maiores temperaturas levariam a uma maior extração desses componentes (Figura 2 e Figura 4). Em contrapartida, como discutido anteriormente, considerando que temperaturas muito elevadas podem degradar compostos bioativos presentes no extrato, optou-se pela manutenção da temperatura de 37 °C, comum do cultivo de bactérias ácido lácticas.

Neste segundo planejamento experimental, portanto, as variáveis independentes foram tempo e inóculo. O inóculo passou a ser centrifugado e ressuscitado em solução salina 0,9% para retirada do meio de cultivo, evitando sua interferência nos resultados. A matriz do planejamento de experimentos está apresentada na Tabela 7.

O ponto central foi conduzido em duplicata, correspondendo aos ensaios 9 e 10. O valor negativo de tempo no ensaio 5 foi considerado como zero.

**Tabela 7 – Matriz do segundo planejamento experimental para a fermentação ácido láctica de *Spirulina platensis* com valores reais e as respostas compostos fenólicos totais e inibição de DPPH**

Ensaio	Tempo (h)	Inóculo (%)	Fenólico totais (mg AGE/L)	Inibição DPPH (%)
1	12	5	690,69	44,89
2	12	25	728,19	45,21
3	84	5	821,25	43,38
4	84	25	818,94	43,32
5	-2,91169	15	393,94	31,97
6	98,91169	15	913,38	50,57
7	48	0,85786	851,81	47,60
8	48	29,14214	891,16	52,08
9	48	15	918,94	54,85
10	48	15	881,44	55,55

**Fonte: Autoria própria**

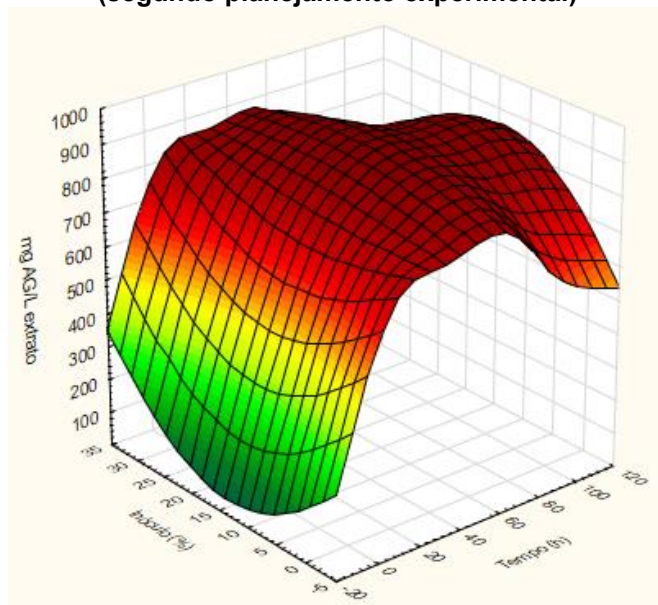
Através do software Statistica, uma regressão quadrática foi feita para cada variável dependente, contudo, o  $R^2$  obtido para cada um foi baixo: 0,151 para compostos fenólicos totais e 0,505 para a inibição de DPPH. Novamente, os modelos matemáticos gerados mostraram-se imprecisos para prever as respostas de bioatividade do extrato fermentado.

Dessa maneira, as superfícies de resposta desse planejamento, mostradas na Figura 8 e Figura 9, também foram construídas pelo método dos mínimos quadrados ponderados.



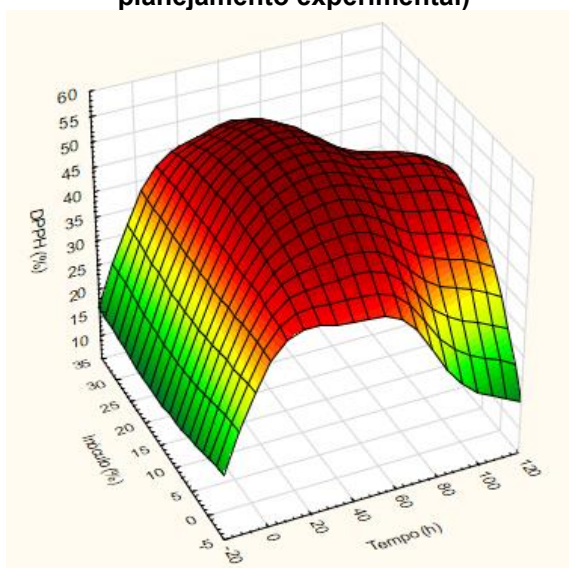
Mais uma vez, é possível perceber que o inóculo exerce pouca influência tanto no conteúdo de compostos fenólicos quanto na atividade antioxidante do extrato. Também pode-se concluir que o tempo é o fator mais significativo.

**Figura 8 - Superfície de resposta de compostos fenólicos totais versus tempo e inóculo (segundo planejamento experimental)**



Fonte: Autoria própria

**Figura 9 - Superfície de resposta de Inibição de DPPH versus tempo e inóculo (segundo planejamento experimental)**



Fonte: Autoria própria

Tanto na Figura 8 quanto na Figura 9 observa-se que a região central da superfície apresenta os melhores valores para ambas as respostas, com o tempo de fermentação em torno de 40 a 60 horas. Dessa maneira, para seguir ao próximo experimento, as seguintes condições foram selecionadas: 40 horas de extração a 37 °C com 15% de inóculo.

## 5.2 INFLUÊNCIA DO INÓCULO DE *Lactobacillus acidophilus* NA EXTRAÇÃO DE *Spirulina platensis*

A partir da reprodução da extração a 37 °C por 40 horas, com ou sem 15% de inóculo, foi possível verificar se realmente houve alguma vantagem da fermentação ácido láctica para a bioatividade do extrato. Os valores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante frente ao DPPH estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8 - Compostos fenólicos totais e inibição de DPPH dos extratos de *S. platensis* sem inóculo de *L. acidophilus* (S) e com inóculo de *L. acidophilus* (SL)**

Amostra	Compostos fenólicos totais (mg AGE/L)	Inibição de DPPH (%)
S	657,76	17,03%
SL	564,78	10,20%

\*Os valores apresentados correspondem à média de uma triplicata  
Fone: Autoria própria

Ainda que a extração de *S. platensis* com a inoculação de *L. acidophilus* tenha sido otimizada, diferente do esperado, ela não se mostrou eficiente em termos de aumento da bioatividade do extrato. Ao contrário, de forma significativa ( $p < 0,05$ ) frente ao extrato sem a adição do lactobacilo, seu conteúdo de compostos fenólicos totais apresentou-se 14,13% menor, enquanto sua capacidade de inibição do radical DPPH foi 40,10% inferior. Esses resultados refletem a pouca influência que o inóculo apresentou na otimização da extração da cianobactéria pela fermentação.

Apesar de ser esperado que a adição da bactéria ácido láctica *L. acidophilus* aumentasse o perfil bioativo do extrato, o resultado não está em desacordo com a literatura. Em um estudo recente, a bioatividade na fermentação de *Spirulina* (2% biomassa + 2% de glicose) com uma mistura de cepas de bactérias ácido lácticas (*L.*

*plantarum*, *L. casei* e duas cepas de *L. acidophilus*) foi avaliada. Após 72 horas, a fermentação reduziu o conteúdo de fenólicos e flavonóides em 29,5 e 24,8%, respectivamente, em relação ao controle (YU *et al.*, 2020a). A redução gradual de fenólicos também foi observada na fermentação de blueberry com *L. brevis*, assim como de antocianina e flavonoides (OH *et al.*, 2017).

Outros estudos, porém, concluem que *Spirulina* fermentada possui maior bioatividade que *Spirulina* não fermentada. Entretanto, é necessário entender qual é a referência que se usa como comparação. Um estudo conduzido em 2011 verificou que o pó de *Spirulina* fermentado com um mix de probióticos apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e de proteção UV superior comparado à biomassa inalterada. Contudo, a *Spirulina* inalterada se refere ao pó, sem nenhum tipo de extração, enquanto a biomassa fermentada passou pelo processo de incubação a 37 °C por 48 horas. Ademais, a fermentação se deu em meio de cultivo composto de leite além de *Spirulina*, agregando as características da fermentação do leite ao extrato (LIU *et al.*, 2011).

Da mesma maneira, outros dois estudos comparam a fermentação de *Spirulina* ao longo de 72 horas com a biomassa não tratada, referindo-se ao tempo 0 da fermentação. Assim, obtendo resultados superiores em relação à atividade antioxidante, teor de fenólicos e concentração de ficocianina (CASTRO; SHANNON; ABU-GHANNAM, 2019; NICCOLAI *et al.*, 2019).

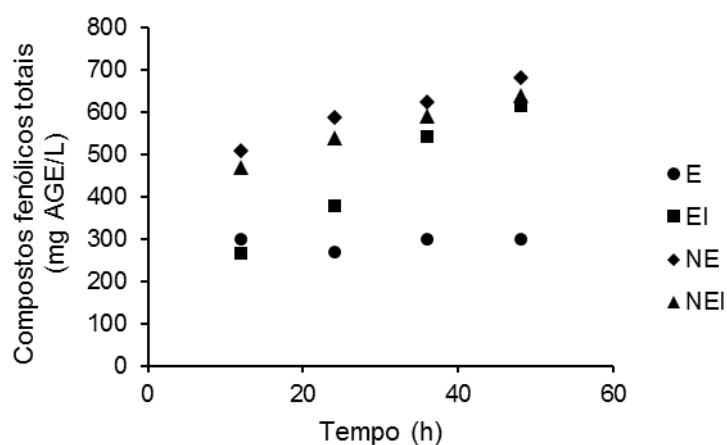
Nesses casos, observa-se que não há comparação da fermentação ácido láctica da biomassa de *Spirulina* com um controle, o qual deveria passar pelas mesmas condições de extração, mas sem o inóculo. A biomassa simplesmente não tratada (tempo 0) obviamente apresenta características bioativas inferiores, uma vez que ela não é submetida à temperatura de 37 °C por determinado tempo. Tais fatores que, como foi apresentado na otimização de fermentação desse trabalho, influenciam nos compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante. Dessa forma, não há como saber se as características alegadas nesses estudos são realmente consequências da ação das bactérias ácido lácticas, ou se são apenas advindas dos fatores temperatura e tempo.

Além dessa questão, outro ponto a se considerar é que a fermentação de *Spirulina platensis* realizada no presente trabalho não é feita de forma totalmente estéril, uma vez que a biomassa apresenta microrganismos associados e que se desenvolvem nas condições de extração. Devido ao seu sistema de produção em

tanques abertos, o cultivo de microalgas em geral é suscetível à contaminação por organismos como zooplânctons, bactérias, vírus e até outras microalgas (WANG *et al.*, 2013). Ainda, a própria manipulação da biomassa após seu processamento pode levar à contaminação por microrganismos.

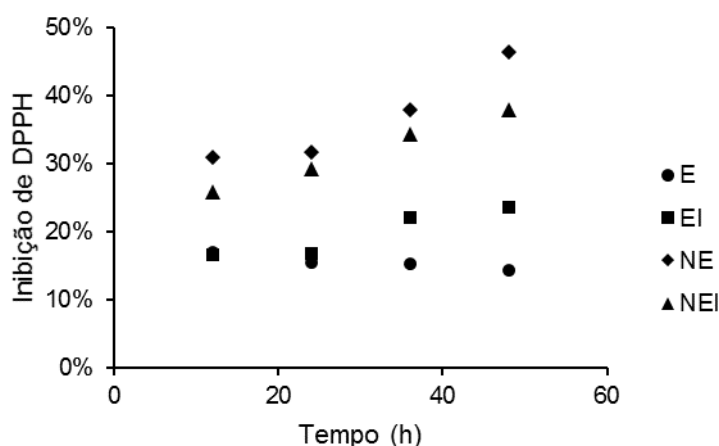
Para entender melhor a variação de bioatividade ao longo da extração, além da interferência das bactérias associadas à biomassa de *S. platensis*, amostras foram analisadas ao longo de 48 horas de extração. O Gráfico 1 e Gráfico 2 demonstram os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos E, EI, NE e NEI.

**Gráfico 1 - Conteúdo de compostos fenólicos totais em 48 horas de extração de *S. platensis* de E, EI, NE e NEI**



\*Os valores apresentados correspondem à média de uma triplicata  
Fonte: Autoria própria

**Gráfico 2 - Inibição de DPPH em 48 horas de extração de *S. platensis* de E, EI, NE e NEI**



\*Os valores apresentados correspondem à média de uma triplicata  
Fonte: Autoria própria

Ao contrário do que havia sido constatado no ensaio anterior, com a biomassa esterilizada fica evidente a capacidade do *L. acidophilus* de aumentar a bioatividade do extrato. Entre 12 e 48 horas de fermentação, o conteúdo de compostos fenólicos de EI aumentou mais que o dobro, partindo de 265,66 para 614,34 mg AGE/L extrato (Gráfico 1). Da mesma forma, a atividade antioxidante foi elevada. Enquanto em 12 horas de extração a inibição do radical de DPPH era de 16,65%, ao final das 48 horas chegou a 23,56%. No extrato E, os compostos fenólicos totais permaneceram os mesmos ( $p > 0,05$ ), enquanto a atividade antioxidante decaiu significativamente em 48 horas ( $p < 0,05$ ).

Já nas extrações realizadas com a biomassa não esterilizada (NE e NEI) ambas apresentaram aumento da bioatividade. Os compostos fenólicos totais aumentaram em cerca de 34 e 36% para NE e NEI, respectivamente, entre 12 e 48 horas de extração. NE exibiu valores maiores ( $p < 0,05$ ) que NEI em 12, 24 e 48 horas, atingindo respectivamente 680,57 e 637,59 mg AGE/L extrato em 48 horas (Gráfico 1). Apenas em 36 horas de extração os valores não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). A capacidade antioxidante de NE apresentou-se estatisticamente maior em todos os momentos analisados, exibindo 46,46% de inibição de DPPH ao final da extração, enquanto NEI exibiu 37,90% (Gráfico 2).

De forma interessante, o aumento da atividade antioxidante foi proporcionalmente similar entre NE, NEI e EI. Enquanto EI apresentou um aumento de 41,49%, em NE e NEI houve um aumento de 50 e 46%, respectivamente. Isso demonstra que, possivelmente, as bactérias presentes nas extrações, seja o *L.*

*acidophilus* ou aquelas associadas à microalga, agem de forma semelhante na evolução da atividade antioxidante.

Ainda assim, o tratamento térmico da biomassa claramente reduz a bioatividade do extrato. Em 12 horas de extração, E apresenta quantidade de fenólicos 1,91 e 1,76 vezes menor, e atividade antioxidante com diferença negativa de 14,35 e 9,24% em relação a NE e NEI, respectivamente. E, apesar de em 48 horas a composição de fenólicos chegar próxima de NE e NEI, a inibição de DPPH permanece inferior. Isso mostra que os compostos fenólicos não são os únicos responsáveis pela atividade antioxidante do extrato de biomassa não esterilizada. A degradação de outros componentes como ficocianina, carotenoides e clorofila é responsável por essa redução (MARTELLI *et al.*, 2020b).

A Tabela 9 mostra que em todos os extratos (com exceção de E), ocorre crescimento bacteriano. Sendo EI produzido a partir da biomassa esterilizada, constata-se que a contagem de colônias se refere somente a *L. acidophilus*. Dessa maneira, o aumento da concentração de bactérias viáveis mostra que a biomassa de *S. platensis* é apta para o crescimento de *L. acidophilus* e funciona como um substrato para tal.

Em NE, como esperado, inicialmente não há bactérias viáveis de forma significativa. Contudo, ao longo da incubação, as condições favorecem a proliferação das células presentes e, após 48 horas, uma concentração elevada de bactérias é encontrada, sendo maior do que em EI.

Em NEI, podemos considerar que a concentração de bactérias inicial se refere ao *L. acidophilus* recém inoculado, uma vez que não há contribuição de bactérias inicialmente associadas à biomassa. A concentração ao final de 48 horas é 2,6 vezes maior que em EI e 1,8 vezes maior que em NEI. Isso indica que, além da proliferação das bactérias associadas a *S. platensis*, possivelmente também houve crescimento de *L. acidophilus*, contribuindo para o maior valor. Portanto, mesmo com o crescimento elevado de outras espécies, a bactéria ácido láctica cresceu igualmente, utilizando a biomassa microalgal não esterilizada como substrato.

Tabela 9 - Concentração de bactérias no início e final das diferentes extrações

Extrato	UFC/mL		Log UFC/mL	
	0 h	48 h	0 h	48 h
EI	$3,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$	6,54	9,28
NE	< 1	$2,7 \times 10^9$	0	9,43
NEI	$3,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^9$	6,48	9,70

\*Os valores apresentados correspondem à média de uma triplicata  
Fonte: Autoria própria

A Figura 10, Figura 11 e Figura 12 mostram as lâminas feitas de cada cultivo. É possível ver que nos cultivos de biomassa não esterilizada (NE e NEI), há pelo menos 3 diferentes tipos de microrganismos no cultivo. Inclusive, é difícil distinguir a bactéria *L. acidophilus* das demais bactérias associadas à biomassa, uma vez que uma espécie de bacilo se mostra presente. Já a lâmina de EI demonstra o monocultivo de *L. acidophilus*, podendo-se considerar que a contagem bacteriana é referente exclusivamente do inóculo.

Figura 10 - Lâmina de Coloração de Gram de NE



Fonte: Autoria própria

**Figura 11 - Lâmina de Coloração de Gram de NEI**



Fonte: Autoria própria

**Figura 12 - Lâmina de Coloração de Gram de EI**



Fonte: Autoria própria

Dois estudos recentes também fazem a comparação do crescimento de bactérias em meio de cultivo composto somente por *Spirulina*. Nas mesmas condições do experimento aqui descrito (37 °C, 100 rpm), a incubação de *Spirulina platensis* com água destilada levou ao crescimento de 9,2 log UFC/mL de bactérias



associadas após 48 horas. Esse valor é muito próximo do encontrado no presente trabalho, equivalente a 9,4 log UFC/mL. A introdução da bactéria ácido láctica (*Lactobacillus plantarum*) também levou a uma maior concentração bacteriana, atingindo 10,5 log UFC/mL, enquanto aqui encontramos 9,7 log UFC/mL (NICCOLAI *et al.*, 2020).

Em outro estudo, o crescimento bacteriano com a biomassa esterilizada em autoclave também foi avaliado. Do início (0 h) ao fim (48 h) da fermentação, *L. casei* e *L. rhamnosus* apresentaram um aumento de 2,13 e 1,5 log UFC/g, respectivamente (MARTELLI *et al.*, 2020b). Já o *L. acidophilus* em EI aumentou em 2,74 log UFC/mL no mesmo tempo de fermentação.

Esses resultados, em concordância com a literatura, inferem que a biomassa de *Spirulina platensis* é um bom substrato para bactérias ácido lácticas, como *L. acidophilus*, sendo ela esterilizada ou não.

Em relação à variação da bioatividade, como já mencionado, em EI fica evidente a capacidade de *L. acidophilus* em aumentar essa característica. Em contrapartida, sua inoculação na biomassa não esterilizada não exibe esse aumento, ainda que, a princípio, as bactérias associadas não interfiram no crescimento de *L. acidophilus*. Algumas possibilidades do porquê isso ocorrer podem ser levantadas:

(i) A co-cultura ou o substrato diferente (biomassa não esterilizada) não permitem que a bactéria inoculada tenha seu desenvolvimento e ação da mesma forma, fazendo com que seu consumo e liberação de componentes bioativos leve à redução da bioatividade.

(ii) as bactérias associadas à biomassa (ou pelo menos uma delas) possuem uma melhor capacidade de elevar a bioatividade do extrato em relação a *L. acidophilus*, devido a diferentes enzimas produzidas por essas cepas, que podem levar à liberação de compostos mais bioativos. Frente à inoculação de bactéria ácido láctica a competição entre as espécies diminuiria essa ação.

Portanto, não necessariamente *L. acidophilus* reduz a bioatividade do extrato. Estudos mais aprofundados sobre as espécies bacterianas associadas à biomassa e a composição desses extratos são necessários para entender o que ocorre nos cultivos.

### 5.3 POTENCIAL PREBIÓTICO CUTÂNEO DOS EXTRATOS DE *Spirulina platensis*

Tendo obtido os extratos de *S. platensis* produzidos de diferentes formas, sua capacidade de inibir ou não as bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* foi analisada em uma concentração de 2,5% do extrato liofilizado. A Tabela 10 mostra a contagem bacteriana de cada cepa frente aos diferentes extratos, após 4 e 24 horas. Algumas contagens apresentaram uma grande quantidade colônias (>300) mesmo na maior diluição ( $10^{-8}$ ), sendo inviável sua enumeração. Para esses casos, ficou indicado o valor  $>3,00 \times 10^{12}$  UFC/mL ou  $>12,48$  log UFC/mL.

**Tabela 10 - Contagem bacteriana de *S. epidermidis* e *S. aureus* após 4 e 24 horas de contato com 2,5% dos extratos de *S. platensis***

Extrato	Cepa	UFC/mL		Log UFC/mL	
		4 h	24 h	4 h	24 h
Controle	<i>S. epidermidis</i>	$>3,00 \times 10^{12}$	$7,47 \times 10^{11}$	$>12,48$	11,87
	<i>S. aureus</i>	$>3,00 \times 10^{12}$	$>3,00 \times 10^{12}$	$>12,48$	$>12,48$
E	<i>S. epidermidis</i>	$4,17 \times 10^8$	$1,40 \times 10^{11}$	8,62	11,15
	<i>S. aureus</i>	$2,70 \times 10^{11}$	$>3,00 \times 10^{12}$	11,43	$>12,48$
EI	<i>S. epidermidis</i>	$6,40 \times 10^8$	$6,40 \times 10^{11}$	8,81	11,81
	<i>S. aureus</i>	$4,47 \times 10^{11}$	$>3,00 \times 10^{12}$	11,65	$>12,48$
NE	<i>S. epidermidis</i>	$2,53 \times 10^8$	$1,70 \times 10^{11}$	8,40	11,23
	<i>S. aureus</i>	$2,13 \times 10^7$	$3,20 \times 10^{10}$	7,33	10,51
NEI	<i>S. epidermidis</i>	$5,27 \times 10^8$	$3,80 \times 10^9$	8,72	9,58
	<i>S. aureus</i>	$6,25 \times 10^{10}$	$1,51 \times 10^{12}$	10,80	12,18

\*Os valores apresentados correspondem à média de uma triplicata

Fonte: Autoria própria

O que se pode observar dos resultados obtidos é que, com exceção dos extratos E e EI após 24 horas para *S. aureus*, todos promoveram a inibição, ainda que em níveis diferentes, de ambas as cepas tanto em 4 quanto em 24 horas de ação.

Em uma ação mais imediata (4 horas), todos os extratos exibiram uma considerável redução de *S. epidermidis*, diminuindo sua carga microbiana em pelo menos 3,67 log UFC/mL até 4,08 log UFC/mL. Já para *S. aureus*, a redução variou mais conforme o extrato, também sendo relevante, reduzindo sua contagem em pelo menos 0,83 log UFC/mL até 5,15 log UFC/mL. Em 4 horas de ação, *S. epidermidis* sofreu maior inibição que *S. aureus* por E, EI e NEI.

Após 24 horas, pôde-se verificar a ação dos extratos em um maior tempo. Em todos os casos, a inibição diminuiu, indicando que, após esse período mais longo, as bactérias de alguma forma conseguem se adaptar melhor aos extratos, sendo uma referência de estabilidade (DI LODOVICO *et al.*, 2020). Ainda assim, há inibição, exceto por parte dos extratos esterilizados para *S. aureus*. E seguindo o padrão de 4 horas de análise, após 24 horas, a inibição de *S. epidermidis* é maior que a de *S. aureus* por E, EI e NEI.

Em ambos os tempos de análise, verifica-se outros padrões. Os extratos de biomassa não esterilizada exerceram maior inibição, provavelmente devido ao seu maior teor de compostos bioativos com ação antibacteriana. Portanto, ainda que a esterilização diminua sua ação contra a bactéria benéfica *S. epidermidis*, também a diminui para a patogênica *S. aureus*.

Outra observação interessante é a menor inibição bacteriana dos extratos com inoculação de *L. acidophilus*. Em 4 horas, por exemplo, a fermentação da biomassa esterilizada permitiu um crescimento 53 e 65% maior de *S. epidermidis* e *S. aureus*, respectivamente. Para os extratos de biomassa não esterilizada, a inoculação da bactéria ácido láctica diminuiu ainda mais a ação antimicrobiana frente a *S. aureus*, a qual apresentou uma contagem de 3,37 log UFC/mL a mais. Já para *S. epidermidis*, houve um crescimento maior em 0,32 log UFC/mL.

Neste caso, a diferença de bioatividade do extrato não explica essa menor inibição bacteriana, uma vez que E exibiu maior atividade antibacteriana que EI, tendo menor conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante. Duas hipóteses por parte da bactéria ácido láctica seriam: o consumo de algum componente antibacteriano ou a produção de algum componente que auxilie no crescimento bacteriano.

Temos na literatura, ações divergentes, como o lisado da bactéria *L. reuteri* que não apresenta efeito de inibição em nenhuma bactéria da pele, incluindo *S. epidermidis* e *S. aureus* (KHMALADZE *et al.*, 2019). Já o extrato de células de *L. brevis* mostrou estimular o crescimento de *S. epidermidis* de modo dose-dependente (HOLZ *et al.*, 2017). Claro que se deve considerar as diferentes espécies usadas, as quais irão apresentar divergências em termos de composição e produção de metabólitos.

Análises de ação prebiótica cutânea ainda são escassas na literatura. As poucas referências existentes são de testes em que um determinado composto

prebiótico promove a fermentação seletiva de *S. epidermidis* (KAO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2014, 2016), sendo focado em compostos ricos em carbono. Porém, tratando-se da avaliação de crescimento das bactérias comensais da pele frente a alguma substância, não há algum protocolo ou interpretação específica para a conclusão de uma ação prebiótica.

Liu-Walsh *et al.* (2021) avaliaram que em co-cultura de *S. epidermidis* e *S. aureus*, aveia coloidal não apresentou nenhum efeito sob *S. aureus*, porém aumentou seletivamente a taxa de crescimento de *S. epidermidis* (LIU-WALSH *et al.*, 2021). Já Balasubramaniam *et al.* (2020) verificaram que a incubação de *S. epidermidis* com coco-caprilato/caprato não interferiu no crescimento da bactéria em relação ao controle (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2020). Para Lodovico *et al.* (2020), a ação prebiótica foi estudada com base na inibição espécie-específica entre cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Com base nessas referências e considerando *S. epidermidis* uma bactéria probiótica da pele e *S. aureus* uma bactéria patogênica, um extrato de característica prebiótica pode ser aquele que: (i) estimula crescimento seletivo de *S. epidermidis*; (ii) não afeta o crescimento de *S. epidermidis*; ou (iii) inibe de forma específica *S. aureus* em relação a *S. epidermidis*.

O presente trabalho buscou fazer uma análise prebiótica segundo a característica (iii), tendo como base o estudo de Lodovico *et al.* (2020). O único extrato que apresentou tal comportamento foi NE. Após 4 horas de análise, a cepa de *S. epidermidis* já demonstrou ser menos inibida pelo extrato que *S. aureus*, porém, a ação em um maior prazo (24 horas) evidenciou essa diferença. Enquanto a bactéria probiótica foi reduzida em 0,64 log UFC/mL, a patogênica foi em pelo menos 1,97 log UFC/mL. Portanto, NE apresenta potencial para ser usado como elemento prebiótico na pele.

Esse seria o primeiro trabalho que relata o potencial uso de *Spirulina platensis* como modulador da microbiota da pele.

Visto que cada vez mais a microbiota cutânea tem mostrado sua importância para a saúde da pele, ingredientes com características prebióticas têm sido buscados tanto para o enfrentamento de doenças, quanto para melhorar a pele esteticamente.

Apesar de mais estudos serem necessários para entender a composição e a ação dos extratos nas bactérias, o extrato de *S. platensis* fermentado pelas próprias

bactérias mostra ser um potencial prebiótico para pele. Além disso, apresenta boa bioatividade, com alto conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, e trata-se de um produto natural. Essas características fazem desse extrato de *S. platensis* uma potencial matéria-prima para a indústria de cosméticos, sendo um ingrediente com apelo multi-funcional, inovador e natural.

## 6 CONCLUSÕES

A partir da otimização da fermentação de *Spirulina platensis* para a produção de um extrato bioativo, verificou-se que o volume de inóculo de *Lactobacillus acidophilus* (CMBI-085) não apresenta grande influência. Da mesma forma, a temperatura possui certa influência em uma determinada faixa de valores, sendo que 37 °C permite uma boa extração e crescimento do inóculo, ao mesmo tempo que não leva à degradação dos compostos bioativos presentes no extrato. Já o tempo mostrou ser a variável dependente mais significativa para a bioatividade do extrato. A partir de superfícies de respostas geradas pelo método dos mínimos quadrados ponderados, inferiu-se que uma maior bioatividade seria obtida entre 40 e 60 horas de fermentação.

Utilizando as condições da região central das superfícies de resposta do segundo planejamento (37 °C, 40 horas e 15% de inóculo), verificou-se que a extração com *L. acidophilus* apresenta menor bioatividade que a extração sem a bactéria. Em contrapartida, a posterior avaliação da fermentação em biomassa esterilizada indicou o aumento tanto de compostos fenólicos quanto de atividade antioxidante ao longo de 48 horas de fermentação. Os resultados indicam que a fermentação por *L. acidophilus* aumenta a bioatividade do extrato de *S. platensis*, porém, quando na presença das bactérias associada à sua biomassa, isso não ocorre.

Das análises de atividade prebiótica cutânea, apenas o extrato não inoculado de biomassa não esterilizada (NE) apresentou bons resultados. Tanto em uma ação imediata quanto após estabilização, o extrato (2,5%) exerceu maior inibição de crescimento da bactéria patógena *Staphylococcus aureus* do que sobre a bactéria probiótica *Staphylococcus epidermidis*, mostrando uma ação espécie-específica.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar as bactérias associadas à biomassa de *Spirulina platensis* e verificar a ação delas em relação à bioatividade do extrato.

- Avaliar a composição dos diferentes extratos com e sem inoculação de *Lactobacillus acidophilus* com biomassa esterilizada e não esterilizada para entender os componentes responsáveis pela bioatividade de cada um.

- Fazer ajustes no método de análise de atividade prebiótica cutânea: ajuste de inóculo para melhorar a contagem; utilizar densidade óptica para determinar o crescimento bacteriano, tornando a análise mais prática.

- Testar menores concentrações do extrato com potencial prebiótico, a fim de verificar se a inibição de *Staphylococcus aureus* permanece relevante enquanto diminui a inibição de *Staphylococcus epidermidis*.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. *et al.* Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in mice: Biochemical and histopathological studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 77, p. 79–85, fev. 2016.
- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–12, jan. 2009.
- ADEL, M. *et al.* Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 436–444, set. 2016.
- AIELLO, G. *et al.* Chemical and biological characterization of *Spirulina* protein hydrolysates: Focus on ACE and DPP-IV activities modulation. **Journal of Functional Foods**, v. 63, p. 103592, dez. 2019.
- ALI, E. A. I.; BARAKAT, B. M.; HASSAN, R. Antioxidant and Angiostatic Effect of *Spirulina platensis* Suspension in Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121523, 8 abr. 2015.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- BALASUBRAMANIAM, A. *et al.* Repurposing INCI-registered compounds as skin prebiotics for probiotic *Staphylococcus epidermidis* against UV-B. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21585, 9 dez. 2020.
- BAO, J. *et al.* Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. **Food Chemistry**, v. 264, p. 64–72, out. 2018.
- BAQUERO, F.; NOMBELA, C. The microbiome as a human organ. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 2–4, jul. 2012.
- BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 20, n. 3, p. 427–



436, 2016.

BARKALLAH, M. *et al.* Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. **LWT**, v. 84, p. 323–330, out. 2017.

BEHESHTIPOUR, H. *et al.* Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* Algae into Probiotic Fermented Milks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 2, p. 144–154, mar. 2013.

BELAY, A. *Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Assurance*. In: GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. (Eds.). . **Spirulina in Human Nutrition and Health**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 1–25.

BELAY, A. Biology and Industrial Production of *Arthrospira (Spirulina)*. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 339–358.

BOUTIN, R. *et al.* *Spirulina platensis* sustainable lipid extracts in alginate-based nanocarriers: An algal approach against biofilms. **Algal Research**, v. 37, p. 160–168, jan. 2019.

BROWN, E. M. *et al.* Seaweed and human health. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 3, p. 205–216, mar. 2014.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 143–155, 15 mar. 2018.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379–389, out. 2003.

CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, p. 312, 28 maio 2019.

CASTANGIA, I. *et al.* Phycocyanin-encapsulating hyalurosomes as carrier for skin delivery and protection from oxidative stress damage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 4, p. 75, 17 abr. 2016a.

CASTANGIA, I. *et al.* Santosomes as natural and efficient carriers for the improvement of phycocyanin reepithelising ability in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 103, p. 149–158, jun. 2016b.

CASTRO, E. DE M.; SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Effect of Fermentation on Enhancing the Nutraceutical Properties of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). **Fermentation**, v. 5, n. 1, p. 28, 19 mar. 2019.

ÇELEKLI, A.; ALSLIBI, Z. A.; BOZKURT, H. ÜSEYİ. Influence of incorporated *Spirulina platensis* on the growth of microflora and physicochemical properties of ayran as a functional food. **Algal Research**, v. 44, p. 101710, dez. 2019.

CHANDRARATHNA, H. P. S. U. *et al.* Marine Microalgae, *Spirulina maxima*-Derived Modified Pectin and Modified Pectin Nanoparticles Modulate the Gut Microbiota and Trigger Immune Responses in Mice. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, p. 175, 21 mar. 2020.

CHRIST-RIBEIRO, A. *et al.* Cytotoxicity, antifungal and anti mycotoxins effects of phenolic compounds from fermented rice bran and *Spirulina* sp. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 190–196, maio 2019.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; FLOROU-PANERI, P. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In: **Handbook of Marine Microalgae**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 233–243.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 4, p. 551–78, dez. 1983.

COGEN, A. L. *et al.* Selective Antimicrobial Action Is Provided by Phenol-Soluble Modulins Derived from *Staphylococcus epidermidis*, a Normal Resident of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. 192–200, jan. 2010.

DE CAIRE, G. Z. *et al.* Effect of *Spirulina platensis* biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 563–565, 2000.

DE MORAIS, M. G. *et al.* Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

DE MULE, M. C. Z.; DE CAIRE, G. Z.; DE CANO, M. S. Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **International Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 93–96, 1996.

DE SOUZA, T. D. *et al.* Profile, antioxidant potential, and applicability of phenolic compounds extracted from *Spirulina platensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 41, p. 2903–2909, 14 out. 2015.

DELSIN, S. D. *et al.* Clinical Efficacy of Dermocosmetic Formulations Containing *Spirulina* Extract on Young and Mature Skin: Effects on the Skin Hydrolipidic Barrier and Structural Properties. **Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics**, v. 04, n. 04, 2015.

DENG, R.; CHOW, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. e33–e45, 5 jul. 2010.

DI LODOVICO, S. *et al.* Prebiotic Combinations Effects on the Colonization of Staphylococcal Skin Strains. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 37, 24 dez. 2020.

DRÉNO, B. *et al.* Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 12, p. 2038–2047, dez. 2016.

EGERT, M.; SIMMERING, R.; RIEDEL, C. The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 1, p. 62–69, jul. 2017.

EL-SHEEKH, M. M. *et al.* Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. **Iranian journal of microbiology**, v. 6, n. 2, p. 112–9, abr. 2014.

ELFAHRI, K. R. *et al.* Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 31–40, jan. 2016.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375–392, 2014.

FINAMORE, A. *et al.* Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly *Spirulina*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

FURBEYRE, H. *et al.* Effects of oral supplementation with *Spirulina* and Chlorella on growth and digestive health in piglets around weaning. **Animal**, v. 12, n. 11, p. 2264–2273, 15 nov. 2018.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 14 ago. 2017.

GILBERT, J. A. *et al.* Current understanding of the human microbiome. **Nature Medicine**, v. 24, n. 4, p. 392–400, 1 abr. 2018.

GLATTHARDT, T. *et al.* Small Molecules Produced by Commensal *Staphylococcus epidermidis* Disrupt Formation of Biofilms by *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 5, 20 dez. 2019.

GOLMAKANI, M.-T. *et al.* Effect of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) powder on probiotic bacteriologically acidified feta-type cheese. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1085–1094, 3 abr. 2019.

GRANATO, D.; NUNES, D. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2016.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, 16 abr. 2011.

GULDAS, M.; IRKIN, R. Influence of *Spirulina latensis* powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk. **Mljekarstvo**, v. 60, n. 4, p. 237–243, 2010.

GUNES, S. *et al.* In vitro evaluation of *Spirulina platensis* extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1824–1832, 2017.

GUPTA, M.; DWIVEDI, U. N.; KHANDELWAL, S. C-Phycocyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. **Toxicology Letters**, v. 204, n. 1, p. 2–11, jul. 2011.

GUR, S. C. *et al.* In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude *Spirulina* extract and C-phycocyanin. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 8, p. 425–433, 2013.

GYENIS, B. *et al.* Use of dried microalgal biomasses to stimulate acid production and growth of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in milk. **Acta Agraria Kaposváriensis**, v. 9, n. 2, p. 53–59, 2005.

HABIB, M. A. B. *et al.* **A Review on Culture, Production and Use of *Spirulina* As Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish**. Roma: [s.n.].

HAMED, I. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 6, p. 1104–1123, nov. 2016.

HASHEMIAN, M. *et al.* Production of Microalgae-Derived High-Protein Biomass to Enhance Food for Animal Feedstock and Human Consumption. In: **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 393–405.

HENRIKSON, R. ***Spirulina* World Food**. 7. ed. Hana, Maui, Hawaii: Ronore Enterprises, Inc., 2010.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 10 ago. 2014.

HOLZ, C. *et al.* Novel bioactive from *Lactobacillus brevis* DSM17250 to stimulate the growth of *Staphylococcus epidermidis* : a pilot study. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 1, p. 121–131, 7 fev. 2017.

HOSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231–1237, 1 maio 2013.

HU, J. *et al.* Dose Effects of Orally Administered *Spirulina* Suspension on Colonic Microbiota in Healthy Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 243, 5 jul. 2019a.

HU, S. *et al.* Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 333–341, maio 2019b.

HUA, P. *et al.* Regulatory Efficacy of *Spirulina platensis* Protease Hydrolyzate on Lipid Metabolism and Gut Microbiota in High-Fat Diet-Fed Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 4023, 13 dez. 2018.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, T. Y. *et al.* Amplification of probiotic bacteria in the skin microbiome to combat *Staphylococcus aureus* infection. **Microbiology Australia**, 2020.

HUR, S. J. *et al.* Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, out. 2014.

ISMAIL, M. F. *et al.* Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 377–87, 2 jun. 2009.

IWASE, T. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 346–349, maio 2010.

JUNG, S.-M. *et al.* *Spirulina* -PCL Nanofiber Wound Dressing to Improve Cutaneous Wound Healing by Enhancing Antioxidative Mechanism. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

JUNG, S. M. *et al.* Assessment of *Spirulina*-PCL nanofiber for the regeneration of dermal fibroblast layers. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 49, n. 1, p. 27–33, 2013.

KANNAUJIYA, V. K. *et al.* Phycobiliproteins and Their Commercial Significance. In:

**Cyanobacteria.** [s.l.] Elsevier, 2019. p. 207–216.

KAO, M.-S. *et al.* Microbiome precision editing: Using PEG as a selective fermentation initiator against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 4, abr. 2017.

KARKOS, P. D. *et al.* *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–4, 2011.

KAY, R. A.; BARTON, L. L. Microalgae as food and supplement. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 555–573, jan. 1991.

KEPEKÇI, R. A.; SAYGIDEGER, S. D. Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 897–905, 23 ago. 2012.

KESHARI, S. *et al.* Butyric Acid from Probiotic *Staphylococcus epidermidis* in the Skin Microbiome Down-Regulates the Ultraviolet-Induced Pro-Inflammatory IL-6 Cytokine via Short-Chain Fatty Acid Receptor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4477, 11 set. 2019.

KHMALADZE, I. *et al.* *Lactobacillus reuteri* DSM 17938—A comparative study on the effect of probiotics and lysates on human skin. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 7, p. 822–828, 15 jul. 2019.

KHOSRAVI, A.; RAZAVI, S. H.; FADDA, A. M. Advanced assessments on innovative methods to improve the bioaccessibility of polyphenols in wheat. **Process Biochemistry**, v. 88, p. 1–14, jan. 2020.

KIM, H.-M. *et al.* Inhibitory Effect of Mast Cell-Mediated Immediate-Type Allergic Reactions in Rats by *Spirulina*. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 7, p. 1071–1076, abr. 1998.

KORDOWSKA-WIATER, M. *et al.* *Spirulina* enhances the viability of *Lactobacillus rhamnosus* E/N after freeze-drying in a protective medium of sucrose and lactulose. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 79–83, jul. 2011.

KORU, E. Earth Food *Spirulina (Arthrospira)*: Production and Quality Standarts. In: EL-SAMRAGY, Y. (Ed.). . **Food Additive**. [s.l.] InTech, 2012. p. 190–202.

KUMAR, V.; BHATNAGAR, A. K.; SRIVASTAVA, J. N. Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 32, p. 7043–7048, 30 dez. 2011.

LAFARGA, T. *et al.* *Spirulina* for the food and functional food industries. **Food Research International**, v. 137, p. 109356, nov. 2020.

LAI, Y. *et al.* Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. **Nature Medicine**, v. 15, n. 12, p. 1377–1382, 22 dez. 2009.

LAI, Y. *et al.* Activation of TLR2 by a Small Molecule Produced by *Staphylococcus epidermidis* Increases Antimicrobial Defense against Bacterial Skin Infections. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 9, p. 2211–2221, set. 2010.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In: **Measurement of Antioxidant Activity & Capacity**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 107–115.

LEBEER, S. *et al.* Topical cream with live lactobacilli modulates the skin microbiome and reduce acne symptoms. **bioRxiv**, p. 463307, 1 jan. 2018.

LEE, J.-J. *et al.* Protective effect of *Arthrospira platensis* extracts against ultraviolet B-induced cellular senescence through inhibition of DNA damage and matrix metalloproteinase-1 expression in human dermal fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, n. May, p. 196–203, ago. 2017.

LEWISOSCAR, F. *et al.* Biofilm Inhibitory Effect of *Spirulina platensis* Extracts on Bacteria of Clinical Significance. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 537–544, 12 jun. 2017.

LI, T.-T. *et al.* Regulatory Efficacy of the Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae *Spirulina platensis* on Lipid Metabolism and Gut Microbiota in High-Fat Diet Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3075, 9 out. 2018.



LI, T.-T. *et al.* Polyunsaturated fatty acids from microalgae *Spirulina platensis* modulates lipid metabolism disorders and gut microbiota in high-fat diet rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110558, set. 2019.

LIU-WALSH, F. *et al.* Prebiotic Colloidal Oat Supports the Growth of Cutaneous Commensal Bacteria Including *S. epidermidis* and Enhances the Production of Lactic Acid. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. Volume 14, p. 73–82, jan. 2021.

LIU, J.-G. *et al.* Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) products fermented with lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1405–1410, jul. 2011.

LIU, P. *et al.* Crude protein from *Spirulina* increases the viability of CCD-986sk cells via the EGFR/MAPK signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 2, p. 771–778, 11 dez. 2018.

LIU, P. *et al.* Wound Healing Potential of *Spirulina* Protein on CCD-986sk Cells. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, p. 130, 22 fev. 2019.

LUPATINI, A. L. *et al.* Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 724–732, fev. 2017.

MA, H. *et al.* Polysaccharide from *Spirulina platensis* ameliorates diphenoxylate-induced constipation symptoms in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1090–1101, jul. 2019.

MACHU, L. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1118–1133, 2015.

MADER, J. *et al.* Calcium spirulan derived from *Spirulina platensis* inhibits herpes simplex virus 1 attachment to human keratinocytes and protects against herpes labialis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 1, p. 197–203.e3, jan. 2016.

MADHYASTHA, H. K. *et al.* uPA dependent and independent mechanisms of wound healing by C-phycocyanin. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6b, p. 2691–2703, 2 dez. 2008.

MAGNE, F. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1474, 19 maio 2020.

MALA, R. *et al.* Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 9, n. 3, p. 1951–1955, 2009.

MANCONIA, M. *et al.* Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: in-vitro in-vivo studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 423–430, 1 abr. 2009.

MANIRAFASHA, E. *et al.* Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282–296, maio 2016.

MARITO, S.; KESHARI, S.; HUANG, C.-M. PEG-8 Laurate Fermentation of *Staphylococcus epidermidis* Reduces the Required Dose of Clindamycin Against *Cutibacterium acnes*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 5103, 19 jul. 2020.

MARTELLI, F. *et al.* *Arthrospira platensis* as Natural Fermentation Booster for Milk and Soy Fermented Beverages. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 350, 18 mar. 2020a.

MARTELLI, F. *et al.* Solid-State Fermentation of *Arthrospira platensis* to Implement New Food Products: Evaluation of Stabilization Treatments and Bacterial Growth on the Volatile Fraction. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 67, 30 dez. 2020b.

MARTINS, S. *et al.* Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, maio 2011.

MAZINANI, S.; FADAEI, V.; KHOSRAVI-DARANI, K. Impact of *Spirulina platensis* on Physicochemical Properties and Viability of *Lactobacillus acidophilus* of Probiotic UF Feta Cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 6, p. 1318–1324, dez. 2016.

MCCULLOUGH, J. L.; KELLY, K. M. Prevention and Treatment of Skin Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, n. 1, p. 323–331, 1 maio 2006.

MELINI, F. *et al.* Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1189, 27 maio 2019.

MENDIOLA, J. A. *et al.* Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1357–1367, jan. 2007.

MIN, S. K. *et al.* Assessment of C-phycoyanin effect on astrocytes-mediated neuroprotection against oxidative brain injury using 2D and 3D astrocyte tissue model. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14418, 24 nov. 2015.

MIRANDA, M. S. *et al.* Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 8, p. 1075–1079, ago. 1998.

MITRA, M.; MISHRA, S. Multiproduct biorefinery from *Arthrospira* spp. towards zero waste: Current status and future trends. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121928, nov. 2019.

MOLNÁR, N.; GYENIS, B.; VARGA, L. Influence of a powdered *Spirulina platensis* biomass on acid production of lactococci in milk. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 380–382, 1 jan. 2005.

MOONS, I.; BARBAROSSA, C.; DE PELSMACKER, P. The Determinants of the Adoption Intention of Eco-friendly Functional Food in Different Market Segments. **Ecological Economics**, v. 151, p. 151–161, set. 2018.

MORANÇAIS, M.; MOUGET, J.-L.; DUMAY, J. Proteins and Pigments. In: **Microalgae in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 145–175.

MOUSAVI, Z. E.; MOUSAVI, M. The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on the physicochemical and functional properties of liquorice root extract. **LWT**, v. 105, p. 164–168, maio 2019.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 64–73, dez. 2011.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential.

**Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 1–16, dez. 2018.

MUSTHAQ, S.; MAZUY, A.; JAKUS, J. The microbiome in dermatology. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 3, p. 390–398, maio 2018.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 122, n. 3, p. 263–269, mar. 2019.

NEYRINCK, A. *et al.* *Spirulina* Protects against Hepatic Inflammation in Aging: An Effect Related to the Modulation of the Gut Microbiota? **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 633, 20 jun. 2017.

NICCOLAI, A. *et al.* Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) biomass for probiotic-based products. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1077–1083, 8 abr. 2019.

NICCOLAI, A. *et al.* Lactic Acid Fermentation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) in a Vegetal Soybean Drink for Developing New Functional Lactose-Free Beverages. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 26 out. 2020.

NODAKE, Y. *et al.* Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe – A blinded randomized clinical trial. **Journal of Dermatological Science**, v. 79, n. 2, p. 119–126, ago. 2015.

NOWRUZI, B.; SARVARI, G.; BLANCO, S. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. **Algal Research**, v. 49, p. 101959, ago. 2020.

OH, B.-T. *et al.* Probiotic-mediated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit fermentation to yield functionalized products for augmented antibacterial and antioxidant activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 5, p. 542–550, nov. 2017.

OZDEMIR, G. *et al.* Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 754–757, set. 2004.

PADYANA, A. K. *et al.* Crystal Structure of a Light-Harvesting Protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 4, p. 893–898, abr. 2001.

PAETZOLD, B. *et al.* Skin microbiome modulation induced by probiotic solutions. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 95, 24 dez. 2019.

PAGELS, F. *et al.* Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 422–443, maio 2019.

PARADA, J. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 225–228, 22 dez. 1998.

PARK, J. H.; LEE, S. I.; KIM, I. H. Effect of dietary *Spirulina (Arthrospira) platensis* on the growth performance, antioxidant enzyme activity, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and breast meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2451–2459, jul. 2018.

PENTÓN-ROL, G. *et al.* C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 42–52, 2011.

PILOTTO, M. R. *et al.* Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 47–52, maio 2019.

PRESCOTT, S. L. *et al.* The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, p. 29, 2017.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

RAO, A. R. *et al.* In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass — A repeated dose study. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 711–717, nov. 2013.

REBOLEIRA, J. *et al.* **Spirulina**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

REMIREZ, D.; LEDÓN, N.; GONZÁLEZ, R. Role of histamine in the inhibitory effects

of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 2, p. 81–85, 2002.

RICIGLIANO, V. A. Microalgae as a promising and sustainable nutrition source for managed honey bees. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 1, maio 2020.

RICIGLIANO, V. A.; SIMONE-FINSTROM, M. Nutritional and prebiotic efficacy of the microalga *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) in honey bees. **Apidologie**, 8 maio 2020.

RODRÍGUEZ, H. *et al.* Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2–3, p. 79–90, jun. 2009.

ROMAY, C. *et al.* C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207–216, 2003.

RZYMSKI, P.; JAŚKIEWICZ, M. Microalgal food supplements from the perspective of Polish consumers: patterns of use, adverse events, and beneficial effects. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 1841–1850, 2017.

SAEEDI, M.; ESLAMIFAR, M.; KHEZRI, K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 582–593, fev. 2019.

SAHIN, S. C. The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 236–243, nov. 2018.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: A review. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 29–46, 1 mar. 2017.

SANNASIMUTHU, A. *et al.* Radical scavenging property of a novel peptide derived from C-terminal SOD domain of superoxide dismutase enzyme in *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 35, p. 519–529, nov. 2018.

SANNASIMUTHU, A. *et al.* Design and characterization of a novel *Arthrospira platensis* glutathione oxido-reductase-derived antioxidant peptide GM15 and its

potent anti-cancer activity via caspase-9 mediated apoptosis in oral cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 135, p. 198–209, maio 2019.

SANNASIMUTHU, A. *et al.* Intracellular oxidative damage due to antibiotics on gut bacteria reduced by glutathione oxidoreductase-derived antioxidant molecule GM15. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 1127–1133, 14 jul. 2020.

SANNASIMUTHU, A.; AROCKIARAJ, J. Intracellular free radical scavenging activity and protective role of mammalian cells by antioxidant peptide from thioredoxin disulfide reductase of *Arthrospira platensis*. **Journal of Functional Foods**, v. 61, p. 103513, out. 2019.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 660–668, dez. 2013.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113–136, 16 abr. 2008.

SELMİ, C. *et al.* The effects of *Spirulina* on anemia and immune function in senior citizens. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 8, n. 3, p. 248–254, 31 maio 2011.

SENNI, K. *et al.* Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. **Marine Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1664–1681, 2011.

SEONG, J. S. *et al.* Antioxidative and Antiaging Activities and Component Analysis of *Lespedeza cuneata* G. Don Extracts Fermented with *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 1961–1970, 28 nov. 2017.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; REMIZE, F.; POUCHERET, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. **Food Research International**, v. 104, n. April 2017, p. 86–99, fev. 2018.

SFRISO, R. *et al.* Revealing the secret life of skin - with the microbiome you never walk alone. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 42, n. 2, p. 116–126, abr. 2020.

SHIN, T.-H. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 244, 25 jan. 2017.

SHU, M. *et al.* Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a Commensal Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55380, 6 fev. 2013.

SILI, C.; TORZILLO, G.; VONSHAK, A. *Arthrospira (Spirulina)*. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. v. 9789400738p. 677–705.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: [s.l.: s.n.]. p. 152–178.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157–171, nov. 2017.

SOUZA, C. *et al.* Development and photoprotective effect of a sunscreen containing the antioxidants *Spirulina* and dimethylmethoxy chromanol on sun-induced skin damage. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 52–64, jun. 2017.

STEFFENS, D. *et al.* A New Biomaterial of Nanofibers with the Microalga *Spirulina* as Scaffolds to Cultivate with Stem Cells for Use in Tissue Engineering. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 710–718, 1 abr. 2013.

STEFFENS, D. *et al.* Development of a new nanofiber scaffold for use with stem cells in a third degree burn animal model. **Burns**, v. 40, n. 8, p. 1650–1660, dez. 2014.

SYARINA, P. N. A. *et al.* Wound healing potential of *Spirulina platensis* extracts on human dermal fibroblast cells. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 385–393, 2015.

TOMASELLI, L. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: VONSHAK, A. (Ed.). **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. Lodres: Taylor & Francis, 1997. p. 1–15.



TSAI, C.-C. *et al.* Applications of *Lactobacillus rhamnosus* Spent Culture Supernatant in Cosmetic Antioxidation, Whitening and Moisture Retention Applications. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 14161–14171, 15 nov. 2013.

VARGA, L. *et al.* Influence of a *Spirulina platensis* Biomass on the Microflora of Fermented ABT Milks During Storage (R1). **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1031–1038, 2002.

VO, T.-S.; RYU, B.; KIM, S.-K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1336–1346, jul. 2013.

VO, T. S. *et al.* *Spirulina maxima* peptides suppress mast cell degranulation via inactivating Akt and MAPKs phosphorylation in RBL-2H3 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 2224–2229, out. 2018.

VO, T. S.; NGO, D. H.; KIM, S. K. Nutritional and Pharmaceutical Properties of Microalgal *Spirulina*. In: **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 299–308.

WAN, D.; WU, Q.; KUČA, K. *Spirulina*. **Nutraceuticals**, p. 569–583, 2016.

WAN, X. *et al.* Anti-diabetic activity of PUFAs-rich extracts of *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina platensis* in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 233–239, jun. 2019.

WANG, B. *et al.* The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, fev. 2017.

WANG, H. *et al.* The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 745–750, jan. 2013.

WANG, Y. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 411–424, 22 jan. 2014.

WANG, Y. *et al.* A Precision Microbiome Approach Using Sucrose for Selective

Augmentation of *Staphylococcus epidermidis* Fermentation against *Propionibacterium acnes*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1870, 9 nov. 2016.

WANG, Z.; MACLEOD, D. T.; DI NARDO, A. Commensal Bacteria Lipoteichoic Acid Increases Skin Mast Cell Antimicrobial Activity against Vaccinia Viruses. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1551–1558, 15 ago. 2012.

WU, L.-C. *et al.* Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, p. 74, 2011.

WU, Q. *et al.* The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 8, p. 1817–1840, 3 ago. 2016.

XIANG, H. *et al.* Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 3, p. 203–243, set. 2019.

XIE, Y. *et al.* The effects of phycoerythrin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the intestinal microbiota in C57BL/6 mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 20, p. 8559–8569, 31 out. 2019.

YIM, H. S. *et al.* Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275–283, 8 abr. 2013.

YOGIANTI, F. *et al.* Inhibitory Effects of Dietary *Spirulina platensis* on UVB-Induced Skin Inflammatory Responses and Carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 10, p. 2610–2619, 2014.

YU, J. *et al.* Effects of different probiotic combinations on the components and bioactivity of *Spirulina*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 543–557, jun. 2020a.

YU, T. *et al.* *Spirulina platensis* alleviates chronic inflammation with modulation of gut microbiota and intestinal permeability in rats fed a high-fat diet. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 15, p. 8603–8613, 7 ago. 2020b.

YUSUF, M. S. *et al.* Value added by *Spirulina platensis* in two different diets on growth performance, gut microbiota, and meat quality of Japanese quails. **Veterinary World**, v. 9, n. 11, p. 1287–1293, 23 nov. 2016.

ZENG, Q. *et al.* Anti-oxidant, hemolysis inhibition, and collagen-stimulating activities of a new hexapeptide derived from *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1655–1665, 2018.

ZENG, Q. *et al.* N-Terminal Acetylation and C-Terminal Amidation of *Spirulina platensis*-Derived Hexapeptide: Anti-Photoaging Activity and Proteomic Analysis. **Marine Drugs**, v. 17, n. 9, p. 520, 4 set. 2019.

ZHAO, D.; SHAH, N. P. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 454–462, out. 2014.